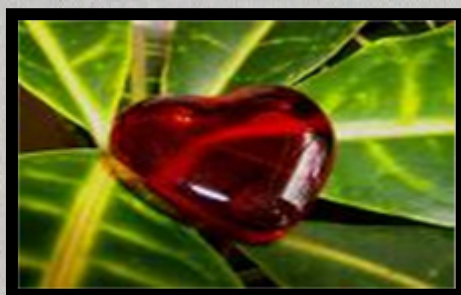


Universidad Autónoma de Madrid

Departamento de Bioquímica



**EFFECTO DEL ÓXIDO NÍTRICO EN FISIOPATOLOGÍA
CARDIOVASCULAR A TRAVÉS
DE LA ACTIVACIÓN DE METALOPROTEASAS**



Tania Rodríguez Lizarbe

Madrid, 2008

Departamento de Bioquímica
Facultad de Medicina
Universidad Autónoma de Madrid



EFFECTO DEL ÓXIDO NÍTRICO EN FISIOPATOLOGÍA CARDIOVASCULAR

A TRAVÉS

DE LA ACTIVACIÓN DE METALOPROTEASAS

Memoria presentada por *Tania Rodríguez Lizarbe* para optar al grado de Doctor.

Licenciada en Ciencias Biológicas (especialidad

Bioquímica y Biología Molecular)

Director:

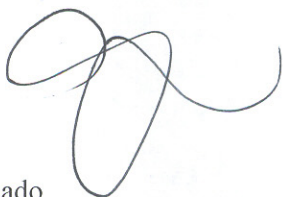
Dr. Carlos Zaragoza Sánchez

Centro Nacional de Investigaciones Cardiovasculares (CNIC)

CERTIFICADO DEL DIRECTOR DE TESIS

El **Dr. Carlos Zaragoza Sánchez**, Investigador Junior del Centro Nacional de Investigaciones Cardiovasculares (CNIC), del Departamento de Aterotrombosis e Imagen Cardiovascular certifica que la doctoranda **Tania Rodríguez Lizarbe**, ha realizado y concluido su trabajo de tesis doctoral bajo el título **“Efecto del Óxido Nítrico en fisiopatología cardiovascular a través de la activación de metaloproteasas.”**

Madrid, a 17 de Diciembre de 2007

A handwritten signature in black ink, consisting of several loops and a long horizontal stroke extending to the right.

Firmado
Dr. Carlos Zaragoza

*A mi familia,
Mis padres, Marisol y José Antonio
Y mi hermano, Iñaki*

AGRADECIMIENTOS

Supongo que esta será, de las pocas veces que, la vida, me presente la oportunidad de agradecer por escrito, en un libro, a todas las personas que han iluminado e iluminan mi vida a cada momento. Gracias porque esto es tan vuestro como mío, gracias por hacer que mi vida sea hoy lo que es. Un continuo aprender lleno y pleno de felicidad.

“ Tras años de camino, entre pipetas y tubos de ensayo, entre papers e ideas que parecían ser y luego no fueron, o aquellas que surgieron repentinamente sorprendiéndome gratamente, puedo concluir que esta experiencia vivida ha sido plenamente gratificante. A pesar de llegar a ti “ciencia” sin saber muy bien en que aventura me embarcaba, me has brindado durante estos años, la posibilidad de crecer como persona, y de encontrar aún más ese gusto por la vida, no sin miedo, al comprender aún más, cuan pequeños somos, y que grande es el misterio de la vida.....Porque como alguien dijo ” cada día sabemos más y entendemos menos” (Einstein), pero quizás la felicidad no está sólo en el conocimiento sino en el deseo irrefrenable y la necesidad de una búsqueda continua del misterio de la vida....Por eso gracias no significa nada.... porque entraste en mi, cambiando mi vida, y en mi te quedarás el resto de mi existencia.

Sin embargo, me es imposible valorar si el aprendizaje durante estos años, ha sido mayor científicamente, o si habéis sido “vosotros” los que formáis parte de mi vida, los que me habéis enseñado tanto o más de lo que significaba este “misterio de la vida”. Porque de cada uno de vosotros, me llevo algo que formará parte de mí, cada día. Durante estos años, he tenido la inmensa suerte de conocer grandes personas, por fuera y por dentro...estas “casualidades de la vida” que han hecho que los caminos de nuestra existencia se hayan cruzado ha sido lo más afortunado que me podía suceder.

En primer lugar, mi director de tesis, el Dr. Carlos Zaragoza, que me ha enseñado desde cero el misterioso mundo de la ciencia; he podido aprender a degustar la ciencia, y creo sinceramente, que a pesar de todas las idas y venidas, que no han sido pocas durante estos años, finalmente he podido formar parte de este, “nuestro” equipo, por todo ello muchas gracias. Porque si algo he aprendido durante esta andadura, es que el éxito pocas veces (a mi entender) ninguna, es personal, sino que el trabajo en equipo brinda los éxitos, por eso, esto no es sólo agradecer vuestro apoyo sino que este libro sin vosotros no sería una realidad. A Conchi.....que decirte que no sepas, no sólo mis manos, muchas veces, sino mi amiga; gracias no es nada, porque aparte de ser la mejor técnico del mundo, trabajar a tu lado cada día ha hecho de mis días de trabajo una alegría, una felicidad, y porque por alguna “ casualidad” de la vida, nos encontramos y la complicidad que hemos creado es insuperable..... días y días de trabajo nos han sucedido, formando ahora parte del pasado , pero se quedan e irán conmigo allá dónde vaya.... ya ahora siento la nostalgia.....gracias por tu trabajo, tu ayuda y sobre todo por tu amistad. Tarín, mi otro compañero de “equipo” que decirte.....sí ya sé.....a estas alturas de la lectura estarás llamándome “flower”pero por “chinchorrón que quieras

parecer" tu corazón parece salirse de tu interior... Gracias por tu apoyo, tus risas y frescura en todo momento, tus palabras de ánimo y esos ratos de discusión científica de los que tanto he disfrutado.....siempre serás mi "chinchorro" especial y favorito.

Y desde luego, a lo largo de estos años tengo que recordar a todos los que una vez fuimos "los lamas" porque cuantos cambios durante estos años, y cuanta nostalgia sentida muchas veces.... A Santiago, muchas gracias por los años en los que he podido formar parte de tu laboratorio, y por supuesto a todos vosotros: M. Angeles, gracias por tu sonrisa de cada día y por esos "remembers" de canciones antiguas, Estrella, gracias por tu aliento cuando a veces flaqueaba y Mariano, gracias por la ayuda prestada. Laura, gracias por tu risa y tus palabras de apoyo; gracias por tu humor Argentino tan irónico e inteligente que tantas alegrías nos daba. Crispu, gracias por tu saber escuchar tu palabra amable diaria, y por supuesto por el super videoclip que tantas tardes de risas y baile nos ha dado. Noemí, por estar ahí aunque no hayamos podido compartir ubicación física. Yoli, gracias por relevarme de ser la "becarita" y por escucharme cuando lo necesitaba, espero que sigas con esa fuerza que te caracteriza porque eres la mejor. Susi, gracias por tu saber escuchar y tus ánimos. María, gracias por tus buenos consejos científicos, y tu escucha, gracias por ser una nota de color, en un mundo a veces gris, pero dónde la bondad también existe. Sara, gracias por ser mi "compi" y amiga y por la escucha diaria, tus buenos consejos; seguro que todo te irá genial allá dónde vayas. Inma, a pesar de estar "al otro lado del charco" llegas igual; gracias por estos años compartidos, por tu amistad, por ser tan genial, y por tus palabras de apoyo...; espero que nunca olvides que "siempre hay un tren que desemboca en Madrid...". Te esperamos. Cris (Beya, beya por fuera y por dentro), Ceci, no sólo gracias, sino como dirían los toreros "va por vosotras". Cuantos consejos y buenas palabras compartidas entre "cultivo y cultivo". Cuantos momentos de esperanza dados, penas y alegrías compartidas, os llevo en mi corazón porque sois muy grandes. Cris, no cambies nunca porque eres de lo que "parece no existir pero existe"; espero que la vida nos permita volver a bailar y soñar together. Ceci, no hace falta decir mucho que no sepas; gracias por estar a mi lado, y por tus palabras de ánimo, por ser mi amiga de corazón. Siento admiración por tu empuje y tu fuerza, admiración por tu tesón y valía. Sé que acabará saliendo, porque contra viento o marea, hay cosas que son así porque, "cuando el trabajo es duro aunque a veces los frutos tarden en llegar, llegarán" Gracias por ser tú, por ser tan grande. Por estar siempre ahí. Andrés por supuesto, gracias también a ti.

Y gracias a todos los que hacéis del laboratorio nuestro mini mundo genial. Fran y Cristina, sin mucho tiempo compartido en poyata, sé que sois geniales. "Las sonsos"; Gemma, halo de risas, alegrías, bailes y música, Raquel, especial por tu corazón, valía humana y científica; completa y repleta de ilusión que generosamente compartes allá dónde vas.... Paqui, que decirte, quiero verte "en lo monólogos"! tienes un gran don y es que dónde vas alegras la vida de las personas... nunca cambies, por favor. Sonso, "jefa" genial donde las haya y compañera estupenda. Sabes que adoro tus lista de colores!!!!. Alfonso, uno de los que ya no quedan!!! eres genial!!.. Rafa, Jimena, Lele en otra ubicación ahora, cuantas alegrías y fiestecitas compartidas. Rafa, gracias por compartir generosamente tus conocimientos conmigo, y siempre nos quedarán esas fotos en los periódicos (ja ja). Y a todos vosotros, Enara, Patricia, Fatima, Óscar, Vanesa, a los que también he tenido

menos tiempo de disfrutaros y que hacéis del labo la maravilla que es. Y por supuesto gracias y una superenhorabuena, para todos lo que formais el departamento de Cardiología Regenerativa, porque a pesar de no mucho tiempo compartido, es suficiente para saber que sois todos geniales, y no podíamos haber caído en un grupo mejor. Gracias por ese espíritu Navideño y a mi “amigo invisible” que alegró mi final. Sé que hacéis del “labo” un mini mundo de alegrías.

Y también fuera del pequeño espacio de nuestro labo, y compartiendo mucho desde Tres Cantos, estáis vosotros los “Juanmis” gracias a todos y cada uno de vosotros, por ser un apoyo y una alegría constante. Sara, Antonio “el niño”, Loli... gracias también a ti, Ara, por esos cafés y por haber seguido con nosotros a pesar de todos los cambios, Esther (secre) por tus risas constantes y esa alegría diaria.....

Y ni que decir tiene, que un hurra especial por esa “super unidad de Citometría”, porque cómo se puede juntar tanta buena gente en un mismo sitio? Esa es la unidad de citometría; gracias Alberto por tus respuestas rápidas incluso “desde el otro lado del charco”, y vosotras “las niñas” que geniales sois, gracias por vuestra, no sólo “ayuda” sino implicación directa con mi trabajo, gracias por esas fotos “fosforochisposas!” que sólo vosotras sois capaces de sacar, y esas celulitas que han sido peor que un “tamagochi”!., es seguro que trabajando sois las mejores, pero como personas difícil encontrar un equipo como este, Raquel, Pili, Elvi, no hay palabras. Y hablando de unidades otra unidad CNIC increíble., Los proteómicos, gracias por vuestro trabajo, vuestra alegría, vuestra chispa de humor diaria, vuestro “belén científico” de navidad. Gracias Juan Antonio, Enrique, Emilio.....por el trabajo que hemos realizado juntos, y por ser vosotros, así de geniales....En el animalario, gracias a Pilar Pallarés y Sandra gracias por tu dedicación constante con mis animalitos y por haber estado siempre en todo lo que he necesitado. Gracias por tus “partes médicos mañaneros!” .Gracias también a Marien y David de la Universidad Complutense de Madrid (CAI) por vuestra ayuda y dedicación con los animalitos. Y a vosotras, chicas de la biblio, que también es un placer el haber compartido a vuestro lado esta recta final. Ali, eres la mejor, algún día quizás solucionemos el mundo.....Mientras tanto, sigue con ese empuje, que ya es tuyo, y tu trabajo duro está a puntito de resplandecer; Irene, gracias por tu alegría diaria!, Elisa, gracias por tus ánimos. Y a la unidad de informática que también ha estado en todo momento, Juan Carlos gracias por tus soluciones rápidas y por tu humor irónico que tanto nos hacía reir cada día.,.Cris, gracias por haberme aguantado en mis “dudillas técnicas” llamémoslo así no?, Fernando, Eva Gloria... Todos vosotros sois geniales. Gracias a la unidad de Compras, Jose Luis, gracias por vuestro trabajo y atención y por esos cafés mañaneros que han alegrado mis últimas mañanas!. Y no puedo olvidarme de ti, Elena, gracias por tu café diario y por esa sonrisa a las 8:00 de la mañana, que tanto me ha alegrado cada día!.

Durante mis andanzas, en estos años, hay dos lugares muy especiales a los que he tenido el inmenso placer de poder acudir en busca de enseñanzas científicas. Gracias al Dr. López-Novoa, y a la doctora Alicia Rodríguez Barbero por enseñarme en mis comienzos en vuestro laboratorio de Salamanca, y también a ti Miguel, por tu alegría de la que también pudimos disfrutar en Madrid y hacer mi estancia allí estupenda. Y

al otro “lado del charco” mil gracias al Dr. Charles Lowenstein (Jonh’s Hopkins Hospital, Baltimore), gracias por haberme dado la oportunidad de formar parte de tu laboratorio, por tus atenciones y enseñanzas diarias. Nunca podría haber sido mejor la experiencia ni humana ni científicamente.

También querría agradecer al Dr. Ignacio Rodríguez Crespo (Universidad Complutense de Madrid), por habernos enseñado la técnica de purificación de proteínas, y al Dr. Carlos López Otín de la Universidad de Oviedo, por habernos cedido generosamente sus ratones, que son de gran importancia para el desarrollo de este trabajo.

Y por supuesto fuera del CNIC, mis amigas incondicionales “las 4 mosqueteras” Inma, Almu, Isa, que haría yo sin vosotras? Gracias, por llevar conmigo toda una vida, y seguir ahí. Sé que teneros no tiene precio....Esto también “va por vosotras”,.....gracias por haber hecho que esto, se convierta en una realidad. Antonio, Miguel, dos mosqueteros más ahora!, gracias.

Mele, que decirte, toda un carrera, y aquí seguimos together, y finalizando la tesis a la vez!! gracias por tus escuchas y tu alegría y por supuesto por “tu brisa marina” que tanto bien nos ha hecho!!! gracias por ser tan genial y estar a mi lado siempre.

Ruth, en tierras lejanas ahora, pero que sigues estando a mi lado, toda una carrera y toda una vida, te echo de menos. Gracias por tantas y tantas experiencias vividas y por todas las risas compartidas.

Lourdes, que eres la mejor del mundo, esto también va por ti. Eres ejemplo para mi vidadeberías ser la musa del trabajo y de la vida. Gracias por acompañarme en todo, por enseñarme tanto, y por ser tan especial y mi amiga. Y a tus padres, que son geniales, y nos hacen sentir muy muy especiales, Que sigamos disfrutando juntas toda la vida, porque aunque nos veamos menos, lo siempre dicho, te llevo muy adentrado en el corazón. Dani eres un tesoro.

Y a todos vosotros, que es una maravilla teneros cerquita, Polo, Canen, Silvia, Jos, Víctor, Chaves, Jimeno, Mikel, Sandra, Lafo, Rober....gracias por ser tan geniales y hacerme sentir tan bien a vuestro lado.

Por supuesto a mi familia, sin vosotros nada de esto hubiera sido posible. Mami, gracias por enseñarme todo y hacerme tal cual soy, por tu coraje y por tu escucha y enseñanza diaria, aunque lo sabes, te admiro profundamente. Te quiero. Papi, sólo uno en el mundo como tú. Gracias por saberme escuchar y por conocerme todo. Gracias por enseñarme a luchar, y a ser buena gente; gracias por enseñarme a vivir. Y por supuesto a mi hermano, Iñaki, (P) que aunque estas “chorradas” no te gusten, sabes que te quiero todo, y que eres mi mayor apoyo, porque sólo tú sabes decir esas frases que tanto me llegan y alegran mi vida. Y por supuesto, Judith porque eres como un sol, que ha llegado a nuestras vidas, no podía ser nadie mejor que tú. A ti Emilia (abuelita) porque eres el gran ejemplo de mi vida. Gracias por ser la persona más bondadosa y buena que conozco; aún sin tú saberlo, me enseñas a vivir y a disfrutar, porque gracias a ti trato de aprender a reponerme de los reveses de la vida.

A por supuesto a mi familia Navarrica, los primeros, mis abuelos (M. Luis e Isidoro) vosotros si que sois un orgullo con mayúsculas, gracias por vuestro amor a pesar de la distancia. Y a todos vosotros, mi familia Navarrica, porque valéis todo, y me dais toda la fuerza del mundo. Hace años que el “no te vayas de Navarra” se instaló en mi corazón, porque eso es lo que sois, mi corazón.

Y por supuesto a mi “nueva familia”, Alicia, Vicente, Amparo, Alvaro, Roberto y Raquel, gracias por acogerme como una más, y por hacer mi vida tan feliz.

Y por último, a ti, Dani, por estar a mi lado cada día y hacer de mi vida un paraíso. No puede existir nada mejor.porque eres la alegría de mi vida, mi apoyo diario y mi mayor ilusión. Gracias.

Siento la longitud de estos agradecimientos, pero me resultaba muy importante, comunicar estos sentimientos.

Gracias a todos. No se puede tener más suerte.

CON TODO MI CARÍÑO Y GRATITUD

Tania

***“Hay dos maneras de vivir su vida:
Una como si nada es un milagro,
La otra como si todo es un milagro.”***

(Albert Einstein)

1879-1955

RESUMEN/ABSTRACT

RESUMEN/ABSTRACT

La alteración de las propiedades fisiológicas del endotelio conocida como disfunción endotelial es el origen de muchas patologías cardiovasculares. El Óxido Nítrico (NO), es determinante para el mantenimiento del tono vascular del endotelio y se ha descrito su implicación en patologías cardiovasculares. En este estudio hemos visto la implicación del NO a través de la activación de metaloproteasas, enzimas que degradan la matriz extracelular, durante dos procesos de la fisiopatología cardiovascular, como son la migración del endotelio vascular y los aneurismas de aorta abdominal (AAA).

En un primer bloque de resultados hemos caracterizado el mecanismo molecular a través del cual el NO permite la migración de las células endoteliales (EC) de aorta. MMP-13 se localiza en las caveolas unida a Caveolina-1, entre los residuos de tirosina 338-360 de la proteasa, y tras sufrir un daño, el NO permite el desacoplamiento de la proteasa de Caveolina-1, a través de la nitración del residuo de tirosina Y338 de MMP-13, favoreciendo la activación de MMP-13 y su liberación al espacio extracelular. Experimentos de reparación tisular in vivo, muestran cómo ratones deficientes para Caveolina-1 presentan acelerado el proceso de reparación tisular, además de encontrar un aumento significativo en la nitración, posiblemente debido a una mayor actividad de la sintasa de óxido nítrico (NOS), lo que supone un incremento en la producción de peroxinitrito, inductor de la nitración y en definitiva de la activación de MMP-13. Sin embargo, los mismos experimentos en ratones deficientes para iNOS y para MMP13, presentan un serio retardo en la reparación tisular, viendo en el primer caso una disminución importante en la capacidad nitrante y en definitiva en la activación de MMP-13, mientras que en el segundo, además se produce una insensibilidad a la inhibición de la nitración, lo que dota de especificidad esta modificación como agente causal de la migración.

Respecto al segundo gran bloque de esta tesis, hemos podido determinar la implicación del NO durante el desarrollo de AAA. En concreto, mediante un modelo quirúrgico desarrollado en ratones, y a partir de muestras de pacientes con AAA, hemos detectado una correlación positiva entre los niveles de diámetro de la aorta con la expresión de los genes iNOS, MMP-13, y el inductor de las MMPs, EMMPRIN. En cuanto al mecanismo del proceso, la ausencia de NO protege frente al desarrollo de AAA gracias a la reducción significativa de EMMPRIN y MMP-13. La sobreexpresión de EMMPRIN en el endotelio de las aortas induce la secreción y la activación de MMP-13 mientras que su silenciamiento conlleva a la inhibición de dicha metaloproteinasa.

Los resultados que hemos obtenido en nuestra investigación, nos permiten afirmar que el NO juega un papel decisivo en la fisiología cardiovascular, a través de la activación de MMPs.

Alterations to the physiological properties of endothelium, known as endothelial dysfunction, lie at the root of many cardiovascular pathologies. Nitric oxide (NO) is critical for the maintenance of vascular tone and has been implicated in cardiovascular diseases. In this study we have identified actions of NO mediated by the activation of matrix metalloproteinases (MMP), enzymes that degrade the extracellular matrix, during two pathophysiological cardiovascular processes: endothelial migration and its effect on abdominal aortic aneurisms (AAA)

In the first group of experiments we have characterized the molecular mechanism through which NO triggers the migration of aortic endothelial cells (EC). MMP-13 localizes to caveolae where it binds to Caveolin-1, in an interaction involving an MMP-13 sequence flanked by tyrosine residues 338 and 360. In response to injury, NO triggers the decoupling of MMP-13 from Caveolin-1 via the nitration of MMP-13 tyrosine 338, which favors the activation of the protease and its release into the extracellular space. In vivo experiments show that mice deficient for Caveolin-1 show an accelerated tissue repair process and a significant increase in protein nitration, possibly due to increased activity of endothelial nitric oxide synthase (eNOS). This increased NO production suggests an increased production of peroxynitrite, a known nitrating agent and the likely activator of MMP-13. In contrast, similar experiments in mice deficient for iNOS or MMP-13 show a notable retardation of tissue repair. In iNOS-deficient mice the capacity for nitration and the activation of MMP-13 are both significantly diminished, while MMP-13 deficient mice are insensitive to inhibition of nitration, which indicates that this modification is a specific agent of migration.

In the second major section on this thesis, we have been able to determine the implication of NO during the onset and progression of AAA. Specifically, using a surgical model developed in mice, and samples from patients with AAA, we have detected a positive correlation between aorta diameter and the expression of the genes for iNOS, MMP-13 and the MMP inducer EMMPRIN. In terms of the mechanisms of this process, the absence of NO protects against the development of AAA by significantly reducing amounts of EMMPRIN and MMP-13. Overexpression of EMMPRIN in the aortic endothelium induces the secretion and activation of MMP-13 while EMMPRIN silencing has the reverse effect.

The results we have obtained in our study lead us to conclude that NO-mediated activation of MMPs plays a decisive role in cardiovascular physiology.

ÍNDICE

| | |
|---|----|
| RESUMEN/ABSTRACT | I |
| ÍNDICE..... | 1 |
| ABREVIATURAS | 3 |
| 1. INTRODUCCIÓN..... | 8 |
| 1.1. Fisiopatología Cardiovascular | 9 |
| 1.1.1. Endotelio Vascular | 9 |
| 1.2. Óxido Nítrico..... | 11 |
| 1.2.1. Descubrimiento y funcionalidad del NO | 11 |
| 1.2.2. Síntesis del NO | 11 |
| 1.2.2.1. Sintetas de NO | 11 |
| 1.2.2.2. Regulación de la actividad de la Sintasa Endotelial de NO (eNOS) | 12 |
| 1.2.3. Rutas de señalización a través de NO..... | 13 |
| 1.2.3.1. Fosforilación de la quinasa dependiente de cGMP | 13 |
| 1.2.3.2. Acción directa del NO | 13 |
| 1.3. Metaloproteasas de matriz extracelular: MMPs | 15 |
| 1.3.1. Introducción..... | 15 |
| 1.3.2. Clasificación y estructura de las MMPs: | 16 |
| 1.3.3 MMP-13 | 17 |
| 1.3.4. Regulación de la actividad enzimática de las MMPs | 18 |
| 1.3.4.1. Regulación transcripcional | 18 |
| 1.3.4.2. Activación..... | 20 |
| 1.3.4.3. Inhibición de la actividad enzimática | 22 |
| 1.4. Caveolas: Significado funcional de la caveolina-1..... | 23 |
| 1.4.1. La Caveolina -1 como “señalosoma”: señalización compartimentalizada. | 24 |
| 1.4.2. Papel de Caveolina-1 en migración celular | 24 |
| 1.5. MMPs y el remodelado vascular en reparación de heridas | 25 |
| 1.6. Aneurismas de aorta (AA)..... | 26 |
| 1.6.1. Características estructurales e histológicas de la aorta..... | 26 |
| 1.6.2. Cambios Histológicos en la pared vascular de las aortas en los Aneurismas | 27 |
| 1.6.3. Aneurismas y MMPs. | 28 |
| 1.6.4. Papel del Stress oxidativo en el desarrollo de los aneurismas de aorta.... | 28 |
| 2. OBJETIVOS..... | 30 |
| 2.1. BLOQUE I: El NO induce el movimiento endotelial mediante la activación de MMP-13, disociándola de Caveolina-1. | 31 |
| 2.2. BLOQUE II: La ausencia de NO protege frente al desarrollo de aneurismas de aorta a través de la modulación de la expresión de MMPs | 31 |
| 3. MATERIALES Y MÉTODOS..... | 32 |
| 4. RESULTADOS | 43 |
| 4.1. BLOQUE I..... | 44 |
| El NO induce el movimiento endotelial mediante la activación de MMP-13, disociándola de Caveolina-1..... | 44 |
| 4.1.1 Determinación molecular del dominio de interacción MMP-13/Caveolina -1 | 44 |

| | |
|---|----|
| 4.1.2. Análisis del efecto del NO en la interacción del complejo MMP-13/Caveolina-1, durante los procesos de migración celular. | 47 |
| 4.1.3. Determinación molecular de la secuencia de interacción de MMP-13 con el CSD de Caveolina-1 en el complejo MMP-13/Caveolina-1. | 48 |
| 4.1.4. Base Molecular del efecto del NO sobre la activación de la proteasa durante los procesos de reparación de herida | 52 |
| 4.1.5. Estudio del NO en los procesos de reparación de herida en modelos de ratón. | 55 |
| 4.2. BLOQUE II | 61 |
| 4.2.1. Estudio del NO en el desarrollo de AAA a través de la activación de metaloproteasas. | 61 |
| 4.2.2 Estudio del papel de EMMPRIN en la regulación de la actividad de MMP-13. | 68 |
| 5. DISCUSIÓN | 71 |
| 5.1. BLOQUE I..... | 72 |
| 5.2. BLOQUE II | 78 |
| 6. CONCLUSIONES..... | 82 |
| 7. BIBLIOGRAFÍA | 84 |
| ANEXO I: PUBLICACIONES | 98 |

ABREVIATURAS

ABREVIATURAS

| | |
|------------------------|---|
| AA A | Aneurisma de aorta abdominal |
| AP-1 | Factor de transcripción activador de la proteína 1 |
| APO A-1 | Apolipoproteína A-1 |
| APO B | Apolipoproteína B |
| BAEC | Células endoteliales bovinas de aorta |
| bFGF | Factor de crecimiento básico de fibroblastos |
| BH₄ | Tetrahidrobiopterina |
| BSA | Suero de Albúmina Bovina |
| Ca²⁺ | Calcio |
| CAD | Enfermedad de la aorta coronaria |
| CBD | Caveolin Binding Domain |
| CaM | Calmodulina |
| CnA | Calcineurina A |
| COX | Subunidad de la citocromo oxidasa |
| CSD | Caveolin Scaffolding Domain |
| CT | Tomografía computerizada |
| EAC | Endothelial aortic cells |
| EC | Células endoteliales |
| ECA | Enzima de conversión de angiotensina |
| ECGF | Factor de crecimiento de células endoteliales |
| ECM | Matriz Extracelular |
| EDRF | Factor de relajación derivado del endotelio. |
| Elk | Factor de transcripción |
| EMMPRIN | Inductor de metaloproteasas de matriz extracelular. |
| eNOS | Sintasa endotelial del óxido nítrico |
| ERK | Proteína activadora de mitógeno |

| | |
|-----------------------------------|---|
| ERN | Especie Reactiva de Nitrógeno |
| ERO | Especies Reactivas de Oxígeno |
| ET-1 | Endotelina 1 |
| FAD | Flavina adenina dinucleótido |
| FHDE | Factor hiperpolarizante derivado del endotelio |
| FMN | Flavín mononucleótido |
| GCs | Guanilato ciclasa soluble |
| GFP | Proteína verde fluorescente |
| GMPc | Guanosin monofosfato cíclico |
| H₂O₂ | Peróxido de hidrógeno |
| h | Hora/s |
| Hsp-90 | Proteína de Heat-shock-90 |
| iNOS | Sintasa inducible del óxido nítrico |
| KO o -/- | Cepa carente de la expresión de un gen específico |
| L-arg | L-arginina |
| LDL | Lipoproteínas de baja densidad |
| MAEC | Células endoteliales de aorta murina |
| MAPK | Proteína quinasa activada por mitógeno |
| min | Minuto/s |
| MKP-1 | MAPK fosfatasa |
| MM-CK | Creatina Quinasa de tipo muscular |
| MMPs | Metaloproteasas de matriz extracelular |
| MnSOD | Manganeso superóxido dismutasa |
| μM | <i>Micro</i> molar |
| nm | <i>Nano</i> metros |
| nNOS | Sintasa neuronal del óxido nítrico |
| NO | Óxido Nítrico |
| NO· | Radical de Óxido Nítrico |

| | |
|-----------------------------------|---|
| NO₂· | Dióxido de Nitrógeno |
| NO₂⁺ | Catión Nitronio |
| NOS | Sintasa del Óxido Nítrico |
| NOSIPN | Proteína de interacción con eNOS |
| NOSTRIN | Traficante de la óxido Nítrico Sintasa |
| 3-NT | 3- Nitrotirosina |
| O₂⁻ | Anión superóxido |
| OH⁻ | Anión hidroxilo |
| ONOO⁻ | Peroxinitrito |
| p38 | Proteína kinasa transformada de mitógeno |
| p53 | Factor de transcripción supresor de tumores |
| PBS | Solución salina de fosfato |
| PDE | Fosfodiesterasa |
| PGI₂ | Postraciclina |
| PKB/AKT | Proteína quinasa B |
| PKG | Proteína quinasa dependiente de cGMP |
| RL | Radical Libre |
| RLO | Radical Libre de Oxígeno |
| RMN | Resonancia Magnética Nuclear |
| RNS | Especies reactivas de Nitrógeno |
| ROS | Especies reactivas del oxígeno |
| siARN | ARN de interferencia |
| SOD | Superóxido Dismutasa |
| STATs | Señales transductoras y moduladoras de la transcripción |
| TBS | Tris buffer salino |
| TFPI-2 | Inhibidor de serín proteasas |
| TGF-β | Factor transformante de crecimiento |
| TIMPs | Inhibidores de tejido de metaloproteasas |

| | |
|------------------------|--|
| TRE | Elemento de respuesta de tumor |
| TXA₂ | Tromboxano A ₂ |
| VEGF | Factor de crecimiento del endotelio vascular |
| VSMC | Células vasculares de músculo liso |
| WT o +/- | Cepa silvestre, control de referencia |
| Zn²⁺ | Átomo de Zn |

1. INTRODUCCIÓN

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Fisiopatología Cardiovascular

1.1.1. Endotelio Vascular

El endotelio vascular es una monocapa de células que recubre la pared luminal de los vasos sanguíneos, regula la interacción de las células y las proteínas circulantes con las células residentes en la pared vascular, ejerciendo un papel central como sensor y transmisor de señales. El endotelio interviene en diversos procesos de embriogénesis, histogénesis, organogénesis, cicatrización, oncogénesis, angiogénesis y metástasis. Entre sus **funciones** protege la pared vascular frente al desarrollo de lesiones y contribuye a la homeostasis vascular a través de ese control continuo de los estímulos que recibe y la adaptación de su estado funcional. El endotelio tiene varias funciones esenciales para la salud, que se ejercen en su mayoría a través de mediadores químicos (Feliciano, do Rosario et al. 1993; Nian, Lee et al. 2004; Galle, Hansen-Hagge et al. 2006). (Fig 1)

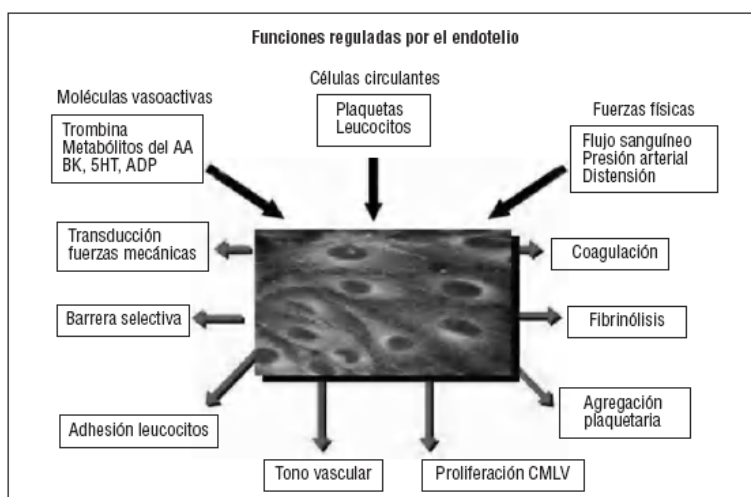


Fig1. Funciones reguladas por el endotelio. Figura adaptada de Rev Esp Cardiol Sup.2006; 6:21A-30A

La función más conocida ejercida por el endotelio es el **mantenimiento de un tono vascular dilatado** en la proporción exacta para conservar la presión arterial en valores normales y permitir la perfusión tisular. Esta función vasodilatadora la ejerce el endotelio por medio de la síntesis y secreción de un factor de relajación que ha sido identificado como el **Óxido Nítrico (NO)**. Este gas inerte regula un mayor número de procesos homeostáticos locales junto con otros factores sintetizados por el endotelio que actúan como vasodilatadores como la PGI₂, el factor hiperpolarizante derivado del endotelio (FHDE) y también sustancias vasoconstrictoras como el tromboxano A₂ (TXA₂), la endotelina (ET1) o radicales libres de oxígeno (RLO), la

enzima de conversión de la angiotensina (ECA) a través de la producción de angiotensina II, que están asociadas a las membranas plasmáticas de las células endoteliales.

El correcto balance en la síntesis de los factores endoteliales es indispensable para la prevención de procesos patológicos del sistema cardiovascular, lo cual ilustra su importancia en este contexto. En concreto, cada vez se conocen más factores que pueden modificar las funciones de endotelio y provocar lo que se conoce como **disfunción endotelial**, término que puede definirse como un desequilibrio en la biodisponibilidad de sustancias activas de origen endotelial que predispone a la inflamación, la vasoconstricción y el incremento de la permeabilidad vascular, y que puede favorecer el desarrollo de fenómenos de hipertensión, aterosclerosis, agregación plaquetaria y trombosis (Moreno, Purushothaman et al. 2006; Boodhwani, Sodha et al. 2007; Deanfield, Halcox et al. 2007)

La importancia del endotelio vascular es de tal magnitud que puede decirse que la disfunción endotelial es un claro **marcador de las enfermedades cardiovasculares** y permite establecer su pronóstico (Suwaidi, Hamasaki et al. 2000). Según la organización mundial de la salud, las enfermedades cardiovasculares causan 12 millones de muertes en el mundo cada año y representan la mitad de todas las muertes en los Estados Unidos y otros países desarrollados, siendo un problema emergente además en muchos países en vías de desarrollo (Chung and Hermann 2006)

En las últimas décadas se ha demostrado que **factores de riesgo coronario** bien conocidos (el colesterol unido a lipoproteínas de baja densidad LDL, el tabaquismo, la diabetes o la hipertensión, entre otros) y otros factores emergentes (radicales libres de oxígeno, homocisteína, infecciones, déficit estrogénico) son capaces de inducir el proceso de disfunción endotelial, cuya respuesta más inminente es lo que se conoce como remodelación de la pared vascular, efecto que da lugar a la ocurrencia de distintos procesos patológicos de la pared de los vasos, incluida la aterosclerosis y los aneurismas (Powell and Greenhalgh 1989).

El endotelio de los vasos sanguíneos, además de lo anteriormente mencionado, es indispensable en un proceso clave de la fisiopatología vascular como es la propia vascularización, un proceso biológico indispensable para el crecimiento de los tejidos normales y neoplásicos. La formación de vasos sanguíneos se produce por dos mecanismos diferentes: **vasculogénesis y angiogénesis**. La vasculogénesis consiste en la formación de vasos embrionarios in situ en el mesoderma extraembrionario, mientras que la angiogénesis o neovascularización es el proceso mediante el cual se forman nuevos vasos sanguíneos a partir de vasos preexistentes. Este proceso fisiológico sucede tanto de forma espontánea como en respuesta a una situación patológica.

Durante la **angiogénesis**, la migración de las células del endotelio vascular juegan un papel fundamental en el proceso. Para que ello tenga lugar se requiere de la actuación de distintos enzimas proteolíticos con el objetivo de romper las uniones celulares a la matriz, entre

los que podemos destacar la especial contribución de las metaloproteasas de matriz extracelular (**MMPs**). Estas enzimas endopeptidasas, a las que con posterioridad vamos a referirnos con más detalle, están implicadas en diversas situaciones y su implicación en los procesos que conllevan un remodelado de la matriz extracelular (ECM) están ampliamente descritos (Newby, Pauschinger et al. 2006); (Lopez-Otin and Matrisian 2007). Además de las MMPs, el endotelio vascular es capaz de sintetizar toda una serie de factores vasoactivos que son capaces de contribuir a la angiogénesis, como el **VEGF** (factor de crecimiento del endotelio vascular) o **bFGF** (factor de crecimiento básico de fibroblastos) y el **NO** al cual nos vamos a referir a continuación con más detalle.

1.2. Óxido Nítrico

1.2.1. Descubrimiento y funcionalidad del NO

El Óxido Nítrico es un **radical libre gaseoso**, que actúa como una molécula mensajera de gran inestabilidad y vida corta, difundiendo por cualquier punto de la membrana de la célula productora para actuar intercelularmente sin requerir ningún tipo de transportador de membrana. Fue descrita por primera vez por Furchgott y Zawadzki (1980) como la existencia de un factor de relajación derivado del endotelio (EDRF) el cual se identificó más adelante como NO (Furchgott, 1999; Ignarro, 1987; Moncada y Higgs, 2006; Plamer 1987). Desde su descubrimiento en el endotelio vascular, se ha descrito su implicación en un gran número de procesos fisiológicos y patológicos (Poppa, Miyashiro et al. 1998; Pineda-Molina and Lamas 2002; Aicher, Heeschen et al. 2003; Liao, Jing et al. 2006), participando de forma especialmente relevante en el **sistema nervioso, el sistema inmune y el sistema cardiovascular**.

1.2.2. Síntesis del NO

1.2.2.1. Sintetasas de NO

El NO es producido por las sintetasas del óxido nítrico, familia enzimática compuesta por tres isoformas; La sintasa neuronal (**nNOS**), la sintasa endotelial (**eNOS**) y la sintasa inducible (**iNOS**). Las tres isoformas enzimáticas generan NO durante el proceso de conversión del amino-ácido L-Arginina en L-Citrulina, obteniendo NO como co-producto de la reacción. Mientras que las isoformas neuronal y endotelial se encuentran constitutivamente expresadas, aunque sujetas a cambios en cuanto a una mayor o menor expresión génica y producen NO de forma constante, a una concentración fisiológica del orden nanomolar, la isoforma inducible se expresa en respuesta a un estímulo, generalmente de tipo pro-inflamatorio y produce NO dentro del rango micromolar, superando en mil veces el producido por las enzimas neuronal y endotelial.

Estructuralmente, las tres isoformas de NOS son enzimas homodiméricas constituidas por tres dominios, los cuales poseen un plegamiento independiente y están separados por un fragmento de cadena polipeptídica que contiene la secuencia consenso de reconocimiento para la calmodulina (Fig 2). A la región amino terminal se le denomina **dominio oxigenasa** y posee dominios de unión consenso para los grupos hemo (hierro-Protoporfirina-IX), 6R-tetrahidrobiopterina (BH_4) y para el sustrato L-Arginina. Por otra parte en el extremo C-terminal, también llamado **dominio reductasa**, se localizan sitios de unión para flavinas, en concreto para la flavín adenin dinucleótido (FAD), flavín mononucleótido (FMN) y para el cosustrato fosfato de nicotín-adenil dinucleótido (NADPH) (Richards and Marletta 1994; Ghosh and Stuehr 1995). Estos dominios terminales están conectados con un tercer **dominio**, que es **afín a calmodulina (CaM)**.

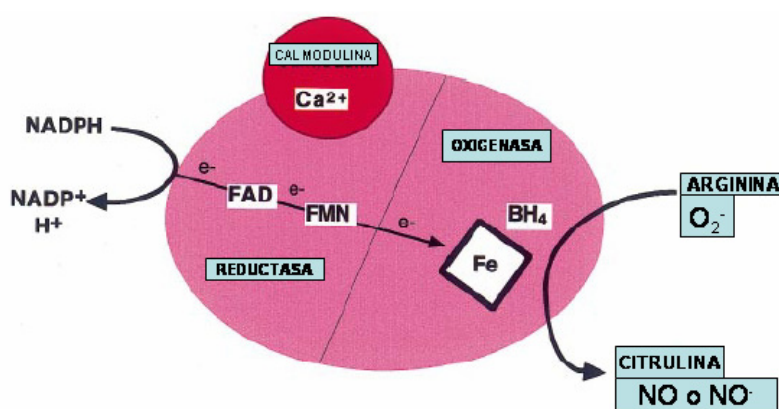


Fig 2. Estructura de las Sintetas de NO y cofactores. Los electrones (e^-) son donados desde NADPH al dominio reductasa de la enzima y avanzan vía FAD y FMN, que son los transportadores tipo redox hasta el dominio oxigenasa. Allí interaccionan con el grupo hierro y el BH_4 en el sitio activo para catalizar la reacción del oxígeno con L-arginina, generando como productos citrulina y NO. En algunas ocasiones se puede producir NO^- como producto de la reacción lo que es debido a que en el flujo de los e^- a través del dominio reductasa requiere de la presencia de Ca^{2+}/CaM . Figura adaptada de ((Alderton, Cooper et al. 2001).

1.2.2.2. Regulación de la actividad de la Sintasa Endotelial de NO (eNOS)

La sintasa de tipo endotelial (**eNOS**) es expresada por las células endoteliales que forman parte de la capa íntima del endotelio vascular y se localiza en la membrana celular **asociada a las caveolas** (Feron 1996; Garcia-Cardena, 1996; Garcias cadena 1997; Michel y Feron; Shaul, 1996). Las caveolas son microdominios de la membrana plasmática que morfológicamente aparecen como invaginaciones membranales en la superficie de las células y que se caracterizan por estar enriquecidas en glicoesfingolípidos, esfingomieline y colesterol, así como en la proteína integral de membrana denominada **Caveolina-1**. Aunque la actividad de eNOS se regula finamente a través de distintos mecanismos (Proteína Heat-shock 90 (Hsp 90), fosforilación, proteínas asociadas NOSTRIN (eNOS traffic inducer protein; (Zimmermann, Opitz et al. 2002)), NOSIPN (eNOS interacting protein;(Dedio, Konig et al. 2001); (Garcia-Cardena, Martasek et al. 1997) en nuestra investigación es la regulación por calmodulina y su interacción con caveolina-1 la que tiene mayor importancia. Calmodulina (CM) fue la primera proteína implicada en la asociación funcional con eNOS (Bredt and Snyder 1990), siendo un

“interruptor molecular” puesto que la unión de CM a su secuencia consenso en la NOS permite el flujo de e^- desde el dominio reductasa hacia el grupo hemo, permitiendo la transformación de O_2 y L-Arginina en NO y L-citrulina (Lin, Fagan et al. 2000; Dedkova and Blatter 2002).

De forma independiente, varios grupos demostraron como eNOS se localiza en caveolas e **interacciona con Caveolina-1, regulando de forma negativa la actividad del enzima** en células endoteliales. En la regulación de eNOS, la Caveolina-1 y el complejo Ca^{2+} /Calmodulina compiten por el mismo sitio alostérico de unión a eNOS, por lo que al aumentar los niveles de Ca^{2+} en el citoplasma celular, bien porque aumente su liberación por el retículo endoplasmático, ó porque se produce un influjo de Ca^{2+} desde el exterior celular al citoplasma, el complejo eNOS /Caveolina-1 se desacopla y eNOS es capaz de unirse al complejo Ca^{2+} /Calmodulina lo que supone la activación de la sintasa (Michel 1999; Fulton, Gratton et al. 2001).

1.2.3. Rutas de señalización a través de NO

1.2.3.1. Fosforilación de la quinasa dependiente de cGMP

El NO actúa como un segundo mensajero realizando una buena parte de sus efectos a través de su unión con su receptor natural, el enzima guanilato ciclasa soluble (**sGC**). Dicha unión tiene como consecuencia la generación de **GMP cíclico (GMPc)**, un potente mensajero secundario, que transmite los efectos del NO a efectores situados a continuación de la cascada de señalización celular encontrando entre sus dianas proteínas quinasa dependientes de cGMP (PKG I y II), fosfodiesterasas reguladas por cGMP (PDE) y canales iónicos regulados por GMPc. La señalización por PKG (en el caso del sistema vascular, a través de PKG I) induce señales proliferativas o antiproliferativas y **el NO a través de su señalización por PKG /MAPK modula la mayor parte de los efectos proliferativos en la expresión de genes**; PKGI, induce la cascada de señalización de las MAPK, ERK1/2, p38, y en definitiva la activación de distintos factores de transcripción. Como ejemplo nuestro laboratorio ha puesto de manifiesto el efecto del NO en esta regulación transcripcional de la metaloproteína MMP-13 a través de la vía del GMPc y la activación de PKG, activando en definitiva el factor de transcripción AP-1 (Zaragoza, Soria et al. 2002). La **señalización anti proliferativa mediada por PKG** se produce a través de la activación de MKP-1(MAPK fosfatasa) y el proteosoma, en este último caso bloqueando la señalización del TGF β , vía Smurf inhibiendo la sintasa del colágeno (Saura, Zaragoza et al. 2002).

1.2.3.2. Acción directa del NO

A pesar de todos los efectos beneficiosos que el NO tiene en el organismo, se debe tener en cuenta el papel del **NO como radical libre**. El NO es una molécula altamente reactiva, muy inestable y que se descompone muy rápidamente, lo que implica que es capaz de reaccionar con otras especies dando lugar a la formación de compuestos radicales y no radicales que se denominan **“especies reactivas de nitrógeno (RNS)”**, entre las que se encuentran los radicales

óxido nítrico (NO^\cdot) y dióxido de nitrógeno (NO_2^\cdot) y los no radicales, catión nitronio (NO_2^+) y peroxinitrito (ONOO^-). En condiciones normales todos los organismos aerobios producen especies reactivas de oxígeno (ERO) como parte de sus procesos metabólicos (anión superóxido (O_2^\cdot), el peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y el radical hidroxilo (OH^\cdot)). Estas moléculas derivadas del oxígeno pueden ser o no radicales libres (RL) y son neutralizadas por el sistema de defensa antioxidante. Sin embargo, un desequilibrio entre la producción y la neutralización de las ERO por los sistemas de defensa antioxidante conlleva la generación de **estrés oxidativo**.

Un mecanismo por el que el NO es capaz de incidir de forma directa sobre determinadas dianas es mediante su asociación con el radical superóxido (O_2^\cdot), dando lugar a la formación de **peroxinitrito (ONOO^-)**.

La acción del peroxinitrito en el organismo ha sido ampliamente estudiada. Es una especie muy oxidante que puede reaccionar con un amplio número de moléculas como aminoácidos, iones metálicos, proteínas y cofactores, entre otros siendo capaz de reaccionar directamente con aminoácidos como la cisteína, la metionina y el triptófano e indirectamente con otros aminoácidos como la fenilalanina, la histidina y la tirosina. **Cuando reacciona con las tirosinas produce 3-nitrotirosina (3-NT)**, modificación que se ha considerado un marcador de la presencia de ONOO^- . La nitración de proteínas puede alterar la conformación y estructura de las mismas, su actividad catalítica y/o su susceptibilidad para su digestión (Castro, Rodriguez et al. 1994; Gow, Duran et al. 1996) y por ello a través de la visualización de nitrotirosina de proteínas se puede llegar a valorar el efecto tóxico del NO, que participa en la interrupción de los procesos de señalización celular y que tiene carácter de lesión difícilmente reversible, aunque se ha descrito recientemente una actividad enzimática denitrasa en algunos tejidos (Kamizaki, Wada et al. 1998).

La relevancia de la nitración de tirosinas de las proteínas en el organismo ha sido ampliamente estudiada encontrándose una clara correlación entre su presencia y la ocurrencia de enfermedades neurodegenerativas como la enfermedad del Alzheimer (Zhang, Xu et al. 2005), o la enfermedad de Huntington (Perez-De La Cruz, Gonzalez-Cortes et al. 2005); (Bagasra, Michaels et al. 1995; Beckman 1996; Uttenthal, Alonso et al. 1998); (Beckman, Chen et al. 1994).

En el sistema cardiovascular, la nitración de tirosinas ha sido analizada por Peluffo y Radi, siendo un descubrimiento nuevo tanto para el sistema cardiovascular normal como para el que padece alguna patología, hasta el punto de que se han podido destacar proteínas nitradas en el espacio intravascular, en la pared de los vasos, y en el miocardio (Fig 3). Como posteriormente analizaremos con un mayor detalle, el papel de la nitración de proteínas es uno de los hallazgos fundamentales de este trabajo.

PROTEÍNAS NITRADAS EN EL SISTEMA CARDIOVASCULAR

| Proteínas Nitradas | Observaciones | |
|---------------------------|--|-------------------------|
| Fibrinógeno | 30% de aumento de fibrinógeno nitrado en CAD (Enfermedad de la arteria coronaria); acelera la formación de coágulos. | Proteínas plasma |
| Plasmina | Aumento en nitración de plasmina y plasminógeno en fumadores. | |
| Apo A-1 | Interacción Apo A-1/MPO. La nitración de la Tyr ¹⁹² dos veces, produce un aumento de la nitración de Apo-1 en CAD. Existe una nitración diferencial de Apo-1 en plasma respecto a otras proteínas. | |
| Apo B | Aumento de 90 veces de LDL nitradas en las lesiones aórticas si se compara con las LDL nitradas en el plasma | Pared del vaso |
| PGIS | Nitración de PGIS en la arteria coronaria endotelial bovina en la Tyr ⁴³⁰ | |
| COX | Inactivación in vitro de COX 1 por nitración. Identificación de COX 1 nitradas en las células musculares lisas, y en las placas de ateroma Humano; Identificación de Tyr ³⁸⁵ nitrada por NO | |
| IA₂-SOD | Identificación de nitración específica en Tyr ³⁴ . Distribución de SOD nitradas en la aorta de la rata. La edad incrementa la nitración de SOD. Identificación de Tyr ³⁴ nitrada en el riñón en los conductos corticales | |
| MM-CK | Nitración e inactivación de MM-CK en el corazón. In vitro inactivación de MM-CK por ONOO ⁻ pero no de miosina ATPasa. Aumento de nitración de MM-CK en fibrilación atrial. | Mitocondio |
| SERCA | Nitración en SERCA ₂ en Tyr ^{294,295} , en corazones de ratas. Nitración de SERCA ₂ en pacientes con cardiomiopatía dilatada idiopática. | |
| α-actinina | Disfunción contráctil de cardiomiocitos después de exposiciones a ONOO ⁻ ; detección de α-actinina nitrada como la única proteína nitrada usada a esa Concentración. | |

Fig 3. Proteínas nitradas en el sistema Cardiovascular. Adaptada de (Peluffo and Radi 2007).

1.3. Metaloproteasas de matriz extracelular: MMPs

1.3.1. Introducción

Las metaloproteasas de matriz extracelular (MMPs) son enzimas endopeptidasas dependientes de Zinc (Zn^{2+}), que se encuentran implicadas en numerosos procesos fisiológicos y patológicos. La función más reconocida para estas enzimas es la degradación de los componentes de la matriz extracelular (Werb 1997; Mott and Werb 2004) que proporciona el soporte sólido a las células (colágeno, elastina, fibronectina, laminina), rompiendo los enlaces peptídicos compuestos por aminoácidos, que encajan en el bolsillo hidrofóbico específico de las MMPs, aunque también se encargan de escindir algunos receptores celulares y otras proteínas de tipo soluble, como son determinados factores de crecimiento y citoquinas (Mott and Werb 2004). Las MMPs están implicadas en el crecimiento y remodelado tisular durante el desarrollo, incluyendo el ciclo endometrial, la migración celular, la formación del esqueleto y en diversas patologías humanas, como el cáncer, enfermedades inflamatorias y autoinmunes, así como enfermedades fibróticas y cerebro-vasculares (Freije, Diez-Itza et al. 1994; Zaragoza, Lopez-

Rivera et al. 2006; Spinale 2007), enfermedades cardiovasculares como la aterosclerosis (Galis, Sukhova et al. 1995; Halpert, Sires et al. 1996) o el desarrollo de aneurismas (Dobrin and Mrkvicka 1994; Curci, Mao et al. 2000).

1.3.2. Clasificación y estructura de las MMPs:

Hasta el momento se han identificado aproximadamente 25 miembros de la familia de las MMPs en vertebrados (Brinckerhoff and Matrisian 2002; Woessner 2002) las cuales, históricamente fueron clasificadas, en función de la especificidad para degradar componentes de la matriz extracelular. De esta manera las MMPs se dividen en colagenasas, gelatinasas, estromelisin, y matrisilinas. Sin embargo, debido a un mayor conocimiento de estas enzimas en los referente a los sustratos que degradan (Lee and Murphy 2004) su clasificación actual atiende fundamentalmente a parámetros estructurales pudiendo clasificarlas en 8 clases, de las que 5 son secretadas y 3 se encuentran ancladas a la membrana (Fig 4).

La estructura de las MMPs puede agruparse en 5 dominios; un **péptido señal**, que dirige la secreción de las MMPs fuera de la célula, gracias a los residuos de naturaleza hidrofóbica, que comprenden entre 17 a 20 aminoácidos. Un **dominio propeptídico**, de unos 80 aminoácidos que tiene una única secuencia conservada PRCG(V/N)PD, cuya función consiste en el mantenimiento de la proteína en una conformación inactiva, lo que consigue dado que la cisteína que se localiza en dicha secuencia forma el “**swich de cisteína**”, que consiste en la formación de una tetracoordinación de esa cistina con un átomo de Zn^{2+} que se localiza en el **dominio catalítico**, que a su vez está unido a tres histidinas; de esta manera el sitio catalítico se mantiene oculto (Knauper, Cowell et al. 1997; Nagase and Woessner 1999). A continuación se encuentra el **dominio catalítico** de unos 170 aminoácidos, dentro del cual, se localiza una secuencia consenso de unión a Zn^{2+} adicional (HEXXHXXGXXH). En este dominio se localiza el átomo de Zn^{2+} catalítico, un átomo de Zn^{2+} con función estructural facilitando su actividad enzimática (Bode, Kress et al. 1994; Bode, Reinemer et al. 1994; Das, Mandal et al. 2003) y 2 átomos de Ca^{2+} . A continuación se localiza una **región bisagra**, de longitud variable, que hace de nexo de unión entre el dominio catalítico y el **dominio carboxilo terminal de tipo hemopexina**.

El **dominio hemopexina** engloba aproximadamente 200 aminoácidos localizados en el extremo C-terminal y flanqueados por un residuo de cisteína en cada extremo del mismo, los cuales se unen favoreciendo el correcto plegamiento del dominio y contribuyendo a actuar sobre determinados sustratos. Esta región es necesaria para degradar colágenos fibrilares, aunque no es necesaria para la actividad catalítica del enzima (Nagase and Woessner 1999; Overall 2002; Folgueras, Pendas et al. 2004) (Fig 4).

1.3.3 MMP-13

Los primeros estudios sobre la **participación de MMP-13 en procesos fisiológicos**, se centraron en su participación en el desarrollo embrionario, particularmente en los procesos de formación y reabsorción ósea, asociados a una **remodelación** controlada de la matriz extracelular (Johansson, Saarialho-Kere et al. 1997). MMP-13 interviene en la osificación primaria durante el desarrollo embrionario y en el remodelado del hueso post-natal, remodelando la matriz extracelular durante la osificación intramembranosa y endocondral (Stahle-Backdahl, Sandstedt et al. 1997); (Johansson, Saarialho-Kere et al. 1997) y juega un papel determinante durante la ovulación en los procesos de angiogénesis. Esta proteasa degrada colágenos fibrilares tipo I, II, III hidrolizando cada una de las cadenas de la triple hélice, siendo

fundamentalmente activa degradando el colágeno tipo II (Mitchell, Magna et al. 1996; Knauper, Cowell et al. 1997), que es el principal componente del cartílago y es por ello que es tan importante en el remodelado óseo.

Además de su implicación en el desarrollo, **MMP-13 también participa en un elevado número de procesos patológicos**, siendo especial su implicación en procesos tumorales y en patologías de naturaleza inflamatoria como la artrosis y la artritis reumatoide (Reboul, Pelletier et al. 1996; McCarthy, Westfall et al. 2001). MMP-13 además, ejerce un papel esencial en el desarrollo de **enfermedades cardiovasculares**, destacando su especial relevancia en insuficiencia cardíaca, así como regulando el contenido de colágeno en la placa aterosclerótica (Spinale 2002; Spinale, Gunasinghe et al. 2002). Por otra parte, también ha podido destacarse su presencia en los **aneurismas de aorta** (Cuaz-Perolin, Jguirim et al. 2006); (Mao, Lee et al. 1999), apartado este último del cual haremos mención especial durante el desarrollo de esta tesis.

1.3.4. Regulación de la actividad enzimática de las MMPs

La actividad proteolítica de las metaloproteasas en general ha de estar finamente regulada debido a que presentan una elevada capacidad degradativa. Existen tres niveles fundamentales de regulación proteolítica, como son la **transcripción, la activación de las formas zimógenas inactivas y la inhibición de su actividad** (Vincenti 2001; Overall and Lopez-Otin 2002); (Page-McCaw, Ewald et al. 2007).

1.3.4.1. Regulación transcripcional

El control en la expresión de los genes a través de cambios en la transcripción es un mecanismo importante de regulación de los niveles de MMPs. La caracterización de los promotores de los genes de las MMPs ha revelado algo sobre los posibles mecanismos que regulan la expresión de las mismas. En los promotores de las distintas metaloproteasas estudiadas se pueden encontrar elementos de respuesta a distintos factores de transcripción, destacando de forma especial, el elemento de respuesta de tumor (TRE), el elemento de unión del activador de la proteína AP-1 (AP-1) y el elemento de unión de la proteína 3 del enhancer del poliovirus A (PEA-3). En general, estos elementos son una constante en la mayoría de las MMPs con la excepción de la gelatinasa MMP-2 que carece de los sitios de unión AP-1 y PEA-3 presentes en el resto de MMPs (Fig 5).



Fig 5. Esquema representativo de los elementos respuesta de un promotor genérico de las MMPs. El elemento de respuesta AP-1 está presente en todos los promotores de MMP con excepción de MMP-2 y MMP-11. Los miembros de la familia de los factores de transcripción Fos y Jun se unen a los sitios AP-1 y TRE. Muchas de las MMPs contienen sitios de unión PEA-3 que unen factores de transcripción de la familia Ets a excepción del promotor de MMP-2 que carece de este sitio. En el promotor de MMP-9 y MMP-1 se localiza el sitio de unión para las subunidades p50 y p65 del complejo NF-KB. En algunos promotores de MMPs se han localizado sitios de unión para STAT. La inhibición de la transcripción de los genes de las MMPs por TGF- β parece suceder por la inhibición en el elemento del promotor TIE (Schonthal, Herrlich et al. 1988; Murphy and Knauper 1997). Es importante saber que estos elementos de respuesta de los promotores pueden existir en distintos sitios específicos de un gen de una MMP o pueden no existir. Por eso, una misma señal, puede causar distintos niveles de activación de una MMP. Figura adaptada de (Gunasinghe, Ikonomidis et al. 2001).

En el caso de **MMP-13** su expresión, está restringida a situaciones en las cuales se requiere un remodelado rápido y efectivo del colágeno de la matriz extracelular y por ello, la desregulación de la misma está relacionada con diversas patologías, destacando su especial implicación en aquellas relacionadas con el disparo tanto de señales de tipo inflamatorio como en aquellas implicadas en procesos de migración celular (Leeman, Curran et al. 2002).

La **región reguladora del gen de MMP-13** está constituida por distintos elementos respuesta, regulando transcripcionalmente la expresión del gen en distintos momentos. Se sabe que en el desarrollo óseo, durante los procesos de diferenciación de los osteoblastos, las células expresan MMP-13. En nuestro laboratorio hemos descrito como el **NO** mediante la ruta del GMPc es capaz de activar PKG1, activando el factor de transcripción **Cbfa1** que es un mediador fundamental de la diferenciación ósea y regula la expresión de MMP-13 de manera transcripcional a través de su interacción con el sitio de unión **OSE-2** del promotor de MMP-13 (Zaragoza, Lopez-Rivera et al. 2006)

Nuestro laboratorio además ha revelado como MMP-13 se regula transcripcionalmente en el endotelio vascular de aorta. En este tipo celular el GMPc a través de la activación de PKG induce la expresión de MMP-13 mediante el factor de transcripción AP-1 (Zaragoza, Soria et al. 2002).

Existen otros mecanismos de regulación del gen de MMP-13 a través de los factores de transcripción STAT (señales transductoras y activadoras de la transcripción), habiéndose descrito la desregulación del gen de MMP-13 por la expresión del **factor de transcripción supresor de tumores p53** (Sun, Cheung et al. 2000). Además, MMP-13 se regula a través de diversas señales extracelulares como **TGF- β** , factor de crecimiento transformante, que modula la expresión de los genes de colágeno tipo I y de MMP-13 a través de la activación de p38 MAPK, PI3K, AKT, p70^{S6k}, en células hepáticas (Ravanti, Hakkinen et al. 1999); (Lechuga,

Hernandez-Nazara et al. 2004). La activación de estas proteínas inicia una cascada de señalización que permite finalmente la activación del gen de MMP-13 (Lechuga, Hernandez-Nazara et al. 2004), que contiene en 5' del sitio de inicio de la transcripción de su promotor una secuencia semejante al elemento de inhibición por **TGF- β (TIE)**.

1.3.4.2. Activación

Las MMPs como muchas otras proteasas **se sintetizan en forma de zimógenos inactivos** y son secretadas al espacio extracelular, donde es necesario que se den una serie de procesos de tipo proteolítico para que sean proteolíticamente activas.

El mecanismo de activación de las MMPs consiste en la ruptura de la tetracoordinación que existe entre la cisteína localizada en la secuencia consenso PRCG(V/N)PD del dominio propéptidico, con el átomo de Zn^{2+} tetracoordinado con tres restos de histidina (de la secuencia consenso HEXXHXXGXXH) del **dominio catalítico**, denominado “**switch de cisteína**”, (Knauper, Cowell et al. 1997; Nagase and Woessner 1999). La primera ruptura proteolítica de la secuencia amino terminal, permite que el sitio de unión al Zn^{2+} del dominio catalítico quede expuesto (Springman, Angleton et al. 1990; Van Wart and Birkedal-Hansen 1990), dando lugar a un cambio conformacional de la molécula que permite que se produzca el ataque por moléculas de agua y la pérdida del dominio propeptídico de la proteasa pasando ésta a la conformación activa.

Activadores de MMPs

Existen diversos factores capaces de activar las MMPs entre los que podemos destacar

1. Óxido Nítrico

EL NO, se ha descrito como una molécula capaz de activar MMPs en distintos tejidos, ya sea a través de la regulación transcripcional de las MMPs, como hemos descrito anteriormente (Zaragoza, Soria et al. 2002) ó a través de la activación directa de las formas proenzimáticas. El NO **activa las MMPs directamente**, habiéndose descrito recientemente la regulación de la expresión de MMP-2 y MMP-9, en placentas de ratas diabéticas, por la sobreexpresión de NO (Pustovrh, Jawerbaum et al. 2007) ó a través de modificaciones postraduccionales del tipo S-Nitrosilación, como es el caso de la activación de MMP-9 por nNOS en glaucomas de retina, a través de la nitrosilación de un residuo de cisteína de la proteasa, (Gu, Kaul et al. 2002; Manabe, Gu et al. 2005), o la S-Nitrosilación de MMP-9 por nNOS, para señalización de muerte celular neuronal (Gu, Kaul et al. 2002), **o mediante la actuación de RNS como el ONOO⁻** en la activación de cascadas de proteasas que contribuyen a la angiogénesis y crecimiento tumoral (Wu, Akaike et al. 2001).

Nosotros, como posteriormente desarrollaremos en más detalle, ponemos de manifiesto la activación de MMP-13 en los procesos de reparación de herida a través de la modificación postraducciona del NO de un residuo de Tyr de la proteasa por nitración.

2. Activador de metaloproteasas: *EMMPRIN/ EMMPRIN (BASIGIN)*

La proteína EMMPRIN (también conocida como basigina, o EMMPRIN) es una glicoproteína transmembrana de la familia de las inmunoglobulinas situada en la superficie celular que tiene un alto nivel de expresión en las células humanas de tipo tumoral (Ellis, Nabeshima et al. 1989; Muraoka, Nabeshima et al. 1993; Polette, Gilles et al. 1997). La expresión elevada de EMMPRIN está correlacionado con la progresión de tumores de gliomas (Sameshima, Nabeshima et al. 2000), hematomas (Jiang, Zhou et al. 2001), carcinomas de células escamosas (van den Oord, Paemen et al. 1997; Bordador, Li et al. 2000) y melanomas (Bordador, Li et al. 2000)

Se ha descrito que **EMMPRIN** en las células tumorales estimula la producción de MMPs por las células estromales, por eso fue denominada con el nombre de EMMPRIN (**Inductor de Metaloproteasas de matriz extracelular**) (Ellis, Nabeshima et al. 1989; Kataoka, DeCastro et al. 1993). EMMPRIN es capaz de estimular en los fibroblastos estromales la producción de MMP-1, MMP2 Y MMP-3 (Ellis, Nabeshima et al. 1989; Kataoka, DeCastro et al. 1993; Sameshima, Nabeshima et al. 2000; Li, Huang et al. 2001; Suzuki, Sato et al. 2004) y a través de la activación de estas MMPs permite la degradación de la matriz extracelular y por lo tanto el crecimiento del tumor y la metástasis.

EMMPRIN está constituida por dos dominios extracelulares de tipo inmunoglobulina, uno de tipo transmembrana y un dominio citoplasmático y forma homoligómeros en forma cis en la membrana plasmática. Está altamente regulada por modificaciones de tipo post-traducciona del tipo glicosilación, habiéndose detectado 3 sitios de glicosilación conservados fundamentales para la funcionalidad de EMMPRIN (Guo, Zucker et al. 1997) y se ha descrito su asociación a caveolina-1 a través del segundo dominio de tipo inmunoglobulina previniendo esta unión la formación de altas formas glicosiladas de EMMPRIN y como consecuencia bloqueando su agregación y su activación (Tang, Chang et al. 2004). Se sabe que el primer dominio tiene la función de ser un receptor y está implicado en la activación de las MMPs, función que queda inhibida al usar anticuerpos expresados contra este dominio (Koch, Staffler et al. 1999).

EMMPRIN, molécula activadora de metaloproteasas, ha sido descrita en diferentes patologías cardiovasculares, siendo constatada recientemente su presencia en el infarto de miocardio (Li, McTiernan et al. 2000), la aterosclerosis (Liang, Major et al. 2002), teniendo capacidad de activación de metaloproteasas en las placas de ateroma durante las lesiones ateroscleróticas (Yoon, Kwon et al. 2005), así como su papel como molécula activadora de

MMP-9 en monocitos y de MMP-2 en células de músculo liso (Yoon, Kwon et al. 2005; Schmidt, Bultmann et al. 2006).

Como posteriormente veremos en más detalle, **nosotros hemos puesto de manifiesto** su especial relevancia en la activación de MMPs durante el desarrollo de **aneurismas abdominales de aorta**.

3. Otras MMPs

En el caso concreto de MMP-13, se ha propuesto una cascada de activación para MMP-13, en la cual otras MMPs se encuentran directamente implicadas. En concreto se ha descrito el procesamiento de MMP-2 o gelatinasa A (Sato, Takino et al. 1994; Nagase 1998) por la metaloproteinasa anclada a membrana **MT1-MMP o MMP-14** siendo **MMP-2** capaz de activar MMP-13 (Knauper, Lopez-Otin et al. 1996). MT1-MMP también es capaz de procesar de manera directa la forma inactiva de MMP-13 y a su vez, MMP-13, presenta la capacidad para procesar la metaloproteasa MMP-2 (Knauper, Cowell et al. 1997) capaz de activar MMP-9 (Fridman, Toth et al. 1995) dando lugar en definitiva a una potente actividad colagenolítica y gelatinolítica. Además de lo expuesto anteriormente, el procesamiento de MMP-13 se lleva a cabo por otros enzimas proteolíticos como son las estromelisin, y en concreto la denominada **MMP-3** (Knauper, Lopez-Otin et al. 1996) la plasmina o la tripsina, este último caso con un efecto inhibitorio, al degradar el dominio C-terminal de MMP-13 por la región bisagra (Knauper, Lopez-Otin et al. 1996)

1.3.4.3. Inhibición de la actividad enzimática

La actividad de las MMPs está regulada por la presencia de inhibidores naturales, denominados inhibidores tisulares de las metaloproteasas específicos de tejido (**TIMPs**) que se localizan en el espacio extracelular. En vertebrados se han localizado 4 TIMPs (TIMP-1, TIMP-2, TIMP-3, TIMP-4). Se trata de proteínas cuyo peso molecular oscila entre los 21-29 kDa que interaccionan estequiométricamente con las MMPs activas uniéndose al centro activo bloqueando la actividad proteolítica de las MMPs y en algunos casos impidiendo la activación del proenzima (Murphy and Willenbrock 1995; Brew, Dinakarpandian et al. 2000; Visse and Nagase 2003).

MMP-13, al igual que el resto de las MMPs, es regulada por la existencia de inhibidores endógenos presentes en el medio extracelular como la **α 2-macroglobulina** (Beekman, Drijfhout et al. 1999) o como el factor inhibidor **TFPI-2** (Herman, Sukhova et al. 2001). Además se caracteriza por exhibir diferente afinidad de unión por los inhibidores tisulares de metaloproteasas específicos de tejido (TIMPs) (Knauper, Lopez-Otin et al. 1996; Gomez, Alonso et al. 1997). En concreto, la interacción de TIMP-3 con MMP-13 es más rápida y superior que la interacción con TIMP-1 y TIMP-2 (Knauper, Lopez-Otin et al. 1996).

1.4. Caveolas: Significado funcional de la caveolina-1

Una de las contribuciones más importantes de esta investigación, radica precisamente en el papel primordial que juega la Caveolina-1 sobre la regulación post-traducional de MMP-13 en relación con el efecto que el NO ejerce sobre esta metaloproteasa en distintos contextos fisiopatológicos concretos tales como la migración del endotelio vascular, la reparación tisular o el desarrollo y progresión de enfermedades del sistema cardiovascular.

Las **caveolas** son invaginaciones de la membrana en la superficie de células epiteliales y endoteliales. Los “lipid rafts” o “balsas de lípidos” (Brown and London 1998; Simons and Toomre 2000) son ínsulas rígidas, de las membranas biológicas, dentro de un mar de fosfolípidos, formadas por colesterol y esfingolípidos (glucoesfingolípidos y esfingomielina). Las caveolas y las balsas lipídicas comparten muchas funciones, diferenciándose en cuanto a la localización de la caveolina, proteína mayoritaria de las caveolas. Cuando **Caveolina-1** se inserta en las balsas lipídicas, forma homooligómeros que confieren la estructura tridimensional precisa para formar las caveolas (Fig 6).

La **relevancia fisiológica de las caveolas** se puede resumir en varios aspectos, como son: el transporte vesicular, la homeostasis del colesterol celular, mecanismos de transducción de señales y su capacidad como proteína supresora de tumores. Nosotros vamos a desarrollar el papel de Caveolina-1, como “señalosoma” y su relevancia en los procesos de migración celular.

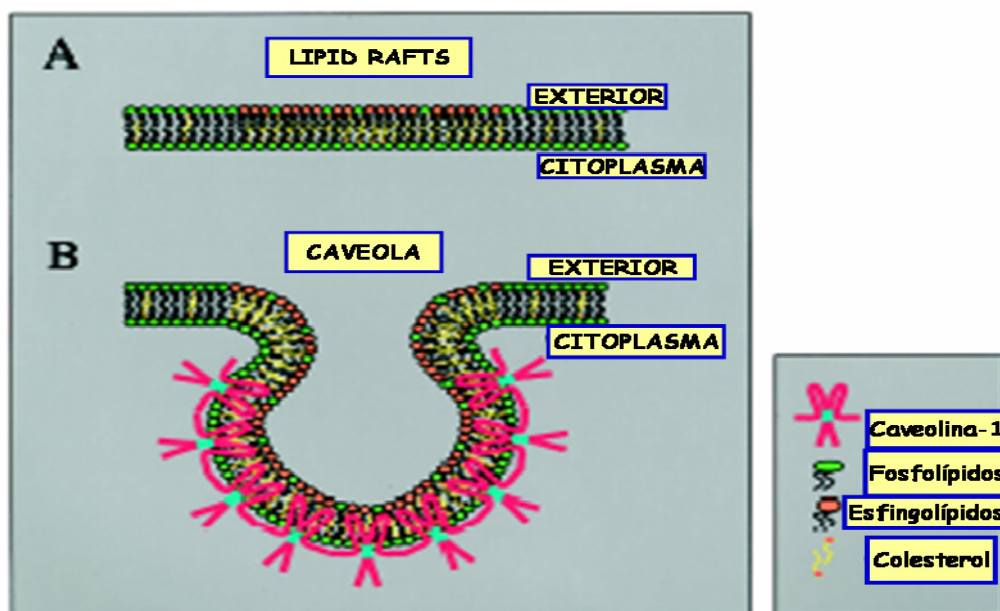


Fig 6. Organización de las balsas lipídicas y caveolas. A. Balsas lipídicas, la “fase ordenada” contiene colesterol y está orientada al exterior celular. La “fase desordenada” se compone básicamente de fosfolípidos (fosfatidilcolina, fosfatidilserina y fosfatidiletanolamina). B. Caveolas. Cuando la Caveolina se inserta en las balsas lipídicas se forman invaginaciones a modo de cueva. La Caveolina-1 forma homo-oligómeros, (simplificados en dímeros de color rosa) que otorgan la estructura tridimensional necesaria para formar las caveolas. El dominio de oligomerización de Cav-1 se muestra en verde. Figura adaptada de (Razani, Woodman et al. 2002).

1.4.1. La Caveolina -1 como “señalosoma”: señalización compartimentalizada.

Las caveolas pueden servir como plataforma para la agregación y concentración de otras proteínas. Actualmente con la ayuda de la proteómica se han identificado numerosas proteínas que se localizan preferentemente en las caveolas, como receptores tirosina quinasa, receptores acoplados a proteínas G, canales iónicos, proteínas adaptadoras y proteínas estructurales. La **Caveolina-1** se presenta como una “proteína andamio” o “proteína de anclaje” (**scaffolding protein**). A través de una región de unos 20 aminoácidos (82-101) denominada “dominio de anclaje de la Caveolina” o “**Caveolin Scaffolding Domain**” (**CSD**) (Fig 7), la Caveolina-1 interacciona con otras proteínas y es capaz de inhibir la hidrólisis de GTP por proteínas G heterotriméricas (Anderson, Uehata et al. 1995) o de regular a otras proteínas como la familia de tirosinas quinasas Src, isoformas de PKC y H-Ras (Shaul, Smart et al. 1996; Engelman, Chu et al. 1998). Además la interacción con el CSD conduce directamente a la inhibición de la señalización de proteínas como es el caso de la eNOS (Razani, Woodman et al. 2002) siendo esta una de las interacciones con Caveolina más estudiada (Cassella, Lawrenson et al. 1996; Garcia-Cardena, Fan et al. 1996; Michel and Feron 1997; Sowa, Pypaert et al. 2001).

Los motivos encontrados en las moléculas que interaccionan con la Caveolina se denominan “**dominio de unión a Caveolina**” o “**Caveolin Binding Domain**” (**CBD**) (Fig 7), aunque la presencia de este motivo no implica la interacción directa de la proteína que lo posea con la Caveolina. Debido a que las secuencias de CSD y CBD están enriquecidas en aminoácidos aromáticos (Couet, Li et al. 1997), se ha sugerido que estas interacciones se pueden producir por yuxtaposición de interacciones hidrofóbicas-hidrofóbicas.

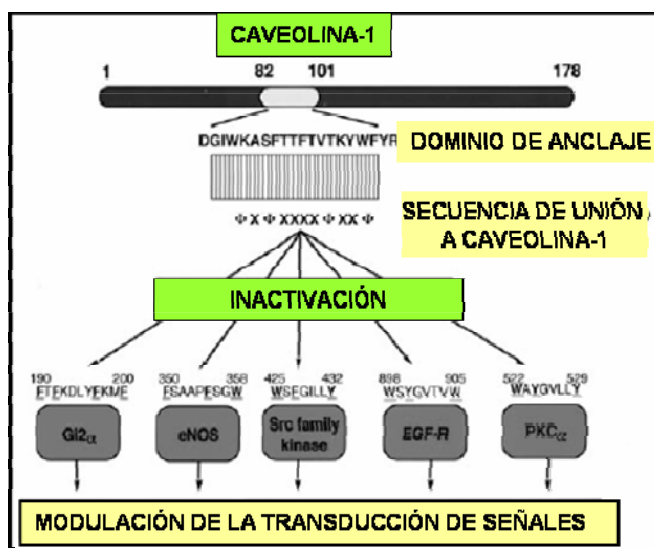


Fig 7. Interacciones de los dominios de anclaje (CSD) y de unión a caveolina-1 (CBD). Secuencia del dominio de anclaje y de unión a caveolina-1 con varias moléculas de señalización, entre las que destaca: G heterotriméricas, eNOS, la familia Src quinasas de la tirosina, EGF-R, e isoformas de PKC (PKCα). En la mayoría de los casos la interacción de las diferentes proteínas de señalización con la caveolina-1 produce un efecto de inhibición y modulación negativa de las vías de transducción de Señales (Razani, Woodman et al. 2002).

1.4.2. Papel de Caveolina-1 en migración celular

La migración celular es esencial en diversos procesos, como la inmunidad, la reparación de heridas, la angiogénesis y la metástasis. Para que se produzca el movimiento celular, se

requieren toda una serie de cambios coordinados, en el citoesqueleto de las células, en los sitios de adhesión de las mismas y en el tráfico de las membranas en respuesta a determinadas señales microambientales, así como, la degradación de los componentes de la matriz extracelular por parte de las MMPs, tanto para la migración de las células normales como para la migración de las células neoplásicas. Se ha descrito un papel para Caveolina-1 en los procesos de migración celular (Isshiki, Ando et al. 2002; Isshiki, Ying et al. 2002), habiéndose encontrado dentro de las caveolas diferentes proteínas que tienen un papel en adhesión, migración e invasión celular, como las integrinas $\alpha V\beta 3$ y $\beta 1$ (Galvez, Matias-Roman et al. 2004) y las metaloproteasas MMP-13 (Lopez-Rivera, Lizarbe et al. 2005), MMP-2 (Puyraimond, Fridman et al. 2001), MT1-MMP (Galvez, Matias-Roman et al. 2004) y MMP-1 en su interacción con EMMPRIN, (Tang and Hemler 2004).

Además, Caveolina-1 juega un papel fundamental en el movimiento celular, a través del control de los componentes de la membrana y de la expansión de la cara externa celular, la polarización de las moléculas de señalización y el remodelado del citoesqueleto. Es capaz de dirigir la formación de las caveolas en la membrana, anclándolas al citoesqueleto de actina, modulando de esta manera las interacciones celulares con la matriz extracelular, la señalización de moléculas y el transporte de colesterol. (Rothberg, Heuser et al. 1992; Shaul and Anderson 1998).

Una vez introducidos los elementos fundamentales que nos han motivado a realizar nuestra investigación, vamos a describir dentro de un contexto más aplicado el efecto que el NO ejerce sobre la expresión y activación de MMPs en distintos aspectos fisiopatológicos.

1.5. MMPs y el remodelado vascular en reparación de heridas

La degradación proteolítica de la matriz extracelular es necesaria en distintos estadios de la reparación tisular, como durante la degradación de la matriz provisional, la angiogénesis, la migración de los queratinocitos y el remodelado del tejido granular. Las proteasas son sintetizadas por distintos tipos celulares durante los diferentes estadios de reparación tisular (así MMP-13 en concreto se secreta por los queratinocitos y en las heridas humanas se ha visto expresada en el tejido conectivo de las heridas (Vaalamo, Weckroth et al. 1996).

La reparación de heridas es un suceso fisiológico, mediante el cual, el tejido herido, pasa a ser reestructurado y a recobrar su funcionalidad. La reparación de las heridas cutáneas, tiene lugar en distintas fases: primero se forma un coágulo de fibrina seguido por un proceso de inflamación (temprana y tardía), a continuación, se produce la reepitelización y la formación del tejido de granulación y por último se forma la matriz y se produce el remodelado vascular.

Función del NO en la reparación de heridas

El proceso de reparación de heridas es biológicamente muy complejo y requiere del sistema inmune innato. Desde hace una década se sabe que el papel del NO en este proceso es esencial y los estudios tanto en animales como en humanos han sugerido que el NO tiene un papel fundamental en la fase inflamatoria del proceso.

El papel del NO en el cierre de heridas fue examinado inicialmente en la década de 1990, cuando se realizaron medidas de los niveles de arginina y sus metabolitos en experimentos de cierre de herida en ratas, encontrándose altos niveles de nitratos y citrulina en las fases iniciales del proceso (Albina, Mills et al. 1990); (Seifter, Rettura et al. 1978). Estudios en los que se aplicaron distintas dosis farmacológicas de arginina, se observó que esta promueve la síntesis de colágeno así como un aumento de la respuesta de los linfocitos (Witte, Kiyama et al. 2002). De todos estos experimentos se pudo concluir que el metabolismo de la L-Arginina juega un papel fundamental en la reparación de heridas y en la función inmune en humanos.

Estudios realizados con ratones deficientes para iNOS, permitieron establecer un papel fundamental para esta enzima (Stallmeyer, Kampfer et al. 1999). En estos ratones el cierre de la herida se encontraba retrasado 4 días respecto de los animales salvajes. Sin embargo, la transfección adenoviral de iNOS revierte el fenotipo deficiente (Yamasaki, Edington et al. 1998). Por otra parte, la aplicación tópica de NO en forma de donador en ratas pone de manifiesto el efecto positivo del mismo en el cierre de heridas, al favorecer la velocidad a la que se produce el proceso, (Shabani, Pulfer et al. 1996).

De todos estos datos se puede concluir que **el efecto del NO en la reparación tisular es evidente; sin embargo la base molecular del efecto era hasta el momento desconocida y nuestra investigación ha profundizado en este aspecto como posteriormente detallaremos.**

Lo expuesto a continuación hace referencia a un vaso en concreto como es la arteria aorta, dado que es el objeto central de nuestra investigación

1.6. Aneurismas de aorta (AA)

1.6.1. Características estructurales e histológicas de la aorta

La aorta está constituida por tres capas concéntricas que le confieren sus características estructurales y funcionales. La capa **íntima** de la aorta está formada por una monocapa de células endoteliales, que se apoya en una membrana basal, constituida fundamentalmente por colágeno tipo IV, laminina y proteoglicanos del tipo heparán sulfato como el perlecano. La capa **media**, formada por células musculares lisas contráctiles, rodeadas por su propia membrana basal y algunos macrófagos y fibroblastos. La matriz de esta capa está constituida por colágeno tipo I y tipo III, distintas glicoproteínas, incluyendo fibronectina, vitronectina, tenascina y trombospodina, junto con proteoglicanos del tipo condroitín y dermatán sulfato, como el

versicano. El componente mayoritario es la **elastina** que se sintetiza fundamentalmente durante el período fetal y se completa en la madurez. Es sintetizada por las células musculares lisas de la capa media arterial y por los fibroblastos de la adventicia, formando láminas concéntricas en las paredes arteriales, en especial en su capa media y da soporte a las arterias en sentido circular y longitudinal, y permite una distribución uniforme de la tensión a lo largo de toda la aorta.

La capa **adventicia** está formada fundamentalmente por tejido conectivo. Esta capa está constituida por abundante colágeno que es sintetizado a lo largo de toda la vida, por las células musculares lisas, que predominan en la capa media, dónde se encuentra su mayor expresión y por los fibroblastos de la adventicia. El colágeno es responsable de mantener la resistencia tensil, o el tono arterial ante los incrementos mayores de la presión transmural, previniendo la distensión excesiva, el ensanchamiento y la disrupción.

1.6.2. Cambios Histológicos en la pared vascular de las aortas en los Aneurismas

Nuestra investigación se ha centrado fundamentalmente en explorar los cambios de la pared vascular en un modelo aplicado como son los aneurismas de aorta abdominal, que a continuación detallaremos. Un aneurisma de aorta se define como una dilatación focal que hace que el diámetro del vaso se extienda hasta una 150% más de lo que mide habitualmente (Johnston, Rutherford et al. 1991). Normalmente es un fenómeno asociado directamente con la edad y que ocurre con mayor frecuencia en la población mayor siendo su prevalencia de aproximadamente 3% de los individuos en edades por encima de los 50 años (Allen, Gourevitch et al. 1987). A pesar de que la etiología de la enfermedad aún no ha sido identificada, se ha asociado a numerosos factores de riesgo, como son, el sexo masculino, la hipertensión, el tabaco y la aterosclerosis (Reed, Reed et al. 1992).

Histológicamente se caracteriza por la destrucción de la elastina y colágeno de las capas media y adventicia de las arterias, acompañado de la pérdida de células musculares, infiltración de linfocitos y macrófagos y neovascularización, así como un remodelado de la matriz extracelular (Powell and Greenhalgh 1989). Durante los AAA también se produce una intensa infiltración de células autoinmunes e inflamatorias desde las partes externas de la pared de la aorta, la apoptosis de las células de músculo liso (VSMCs) y la ruptura de la matriz extracelular, y como consecuencia, alteraciones significativas en los componentes de la misma. El remodelado de los componentes de la ECM parecen ser uno de los factores determinantes en la progresión y patogenia de las AAA y **las MMPs juegan un papel determinante** en esta progresión.

1.6.3. Aneurismas y MMPs.

En los tejidos normales es fundamental el balance entre la síntesis y la degradación de matriz extracelular, sin embargo, en los aneurismas de aorta el papel de las metaloproteasa de matriz extracelular se encuentra desregulado.

En la formación progresiva de un AAA, en la pared vascular, aparecen un elevado número de colagenasas activas y una sobreproducción de enzimas protelíticas responsables del remodelado de la ECM (Wills, Thompson et al. 1996). Las MMPs juegan un papel fundamental en el desarrollo de las AA (Newman, Ogata et al. 1994; Thompson, Holmes et al. 1995) junto con otras proteasas que degradan tejido conectivo como la plasmina, el activador del plasminógeno, sus inhibidores, las serín elastasas y las catepsinas. Existen evidencias directas que permiten afirmar que el papel de las MMPs en los AAA se pueden resumir en la existencia de una sobreexpresión en los niveles de MMPs si se comparan con los tejidos normales (Palombo, Maione et al. 1999), y la aparición de cambios en la expresión de los inhibidores de las mismas (TIMPs) (Grange, Davis et al. 1997; Thompson and Baxter 1999; Ailawadi, Eliason et al. 2003).

Hasta el momento diferentes MMPs han sido implicadas en el desarrollo de los aneurismas: se ha visto incremento de la expresión en las enzimas de tipo elastolítico **MMP-2** y **MMP-9** (Crowther, Goodall et al. 2000; Lindholt, Vammen et al. 2000; Bown, Burton et al. 2003), también de **MT1-MMP** (Crowther, Goodall et al. 2000), así como de la colagenasa única capaz de degradar colágeno tipo II en ratones, **MMP-13**, aumentada tanto a nivel de RNA mensajero como a nivel de expresión en las células musculares lisas, de las aortas de pacientes con aneurismas (Mao, Lee et al. 1999).

1.6.4. Papel del Stress oxidativo en el desarrollo de los aneurismas de aorta

Los aneurismas son una enfermedad con características comunes a otras muchas formas de enfermedades crónicas de inflamación y degeneración de tejidos, como aterosclerosis o la hipertensión. Durante los AAA existe un elevado número de leucocitos infiltrados, particularmente macrófagos, que son capaces de generar grandes cantidades de O_2^- y otras especies oxidantes, además de las SMC, las células endoteliales y los fibroblastos.

En los aneurismas de aorta se ha detectado un incremento significativo en la producción del factor vasoactivo óxido nítrico (NO) a través de la actividad de la isoforma inducible de la sintasa de óxido nítrico (iNOS), en especial por parte de las células musculares lisas y macrófagos infiltrados, principales productores de NO en el organismo. El NO producido por iNOS es perjudicial durante el desarrollo de AA, observando en estudios en animales en los que

su producción ha sido inhibida un descenso significativo en la sintomatología de la enfermedad. También durante el desarrollo de los aneurismas los niveles de nitritos (marcador de la formación de NO) se encuentran elevados, así como los niveles de ROS y RNS. En las muestras de pacientes con AAA se observó que los niveles de peroxidación de lípidos estaban aumentados, al compararlos con pacientes sanos, así como niveles elevados de expresión de iNOS en la capa media y en la adventicia. Estos valores aumentados se localizaban fundamentalmente en linfocitos, macrófagos y SMC y se asociaban con una **tinción inmunohistoquímica de nitrotirosina positiva** (marcador de modificaciones por distintas especies oxidantes, como el peroxinitrito) en los aminoácidos de las mismas.

Uno de los principales moduladores de la actividad de las MMPs es el estrés Oxidativo (Saari, Suomalainen et al. 1990; Rajagopalan, Meng et al. 1996) y se ha visto que es capaz de activar distintas enzimas, incluidas las MMPs, y por lo tanto permitir la degradación de la matriz extracelular (Rajagopalan, Meng et al. 1996).

En este trabajo tratamos de vislumbrar el efecto del NO en los aneurismas, a través de la formación de peroxinitrito y cómo este elemento altamente citotóxico podría estar dañando la pared aórtica.

2. OBJETIVOS

2. OBJETIVOS

2.1. BLOQUE I: El NO induce el movimiento endotelial mediante la activación de MMP-13, disociándola de Caveolina-1.

1. Determinación molecular del dominio de interacción de MMP-13/Caveolina-1.
2. Análisis del efecto del NO en la interacción del complejo MMP-13/Caveolina-1, durante los procesos de migración celular.
3. Determinación molecular de la secuencia de interacción de MMP-13 con el CSD de Caveolina-1 en el complejo MMP-13/Caveolina-1
4. Base molecular del efecto del NO sobre la activación de la proteasa durante los procesos de reparación de herida.
5. Estudio del NO en los procesos de reparación de herida en modelos de ratón.

2.2. BLOQUE II: La ausencia de NO protege frente al desarrollo de aneurismas de aorta a través de la modulación de la expresión de MMPs

1. Estudio del NO en el desarrollo de AAA a través de la activación de metaloproteasas.
2. Estudio del papel de EMMPRIN en la regulación de la actividad de MMP-13.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3. MATERIALES Y MÉTODOS

MATERIALES:

1. Células

Las células endoteliales bovinas (BAEC) se aislaron a partir de la aorta torácica de vaca, tras un lavado con solución salina (PBS), mediante digestión con collagenasa tipo I_A durante 30 minutos a 37 ° C. Las células endoteliales se recogieron en solución salina Hanks (Sigma), fueron centrifugadas durante 5 minutos a 1000 rpm y resuspendidas en medio completo: RPMI 1840 (Sigma) suplementado con un 10% de suero de ternera (Biowhittaker), heparina 10 mg/ml (Sigma), fungizona 2.5µg/ml (Biowhittaker) y 5% antibióticos: penicilina/streptomycin (Biowhittaker). El cultivo se mantuvo en placas previamente gelatinizadas (Sigma) al 0.2%.

Las células endoteliales de aorta de ratón (MAEC) se obtuvieron según fue descrito en (Lopez-Rivera, Lizarbe et al. 2005). La aorta toracicoabdominal se limpió de restos de grasa y músculo embebida en solución salina Hanks suplementada con penicilina/Streptomycin (10 mg/ml) y anfotericina B (1.25 mg/ml), tras lo cual, fue cortada en secciones en torno a 1 mm de longitud. Dichas secciones se colocaron en placas de 35 mm sobre cubres estériles que contienen 100µl de matrigel (BD Matrigel Matriz, BD Biosciences). Cada sección ha de quedar completamente embebida en el matrigel, evitando la formación de burbujas. Tras incubar 30 minutos a 37 °C, en los que el gel ha de solidificar correctamente, se añaden 2 ml de medio completo: DMEM F12 (compuesto por una mezcla 1:1 de HAM F12 y DMEM) (Biowhittaker) suplementado con 20% de suero fetal bovino, ECGF 100 µg/ml, y antibióticos 5%: penicilina/streptomycin (Biowhittaker). Para la extracción de las células del matrigel se retira el medio y con unas pinzas estériles se extrae el fragmento de aorta el cual se lava con PBS frío y se añaden 500 µl de BD Cell Recovery Solution (MatriSpere, BD Bioscience) para disolver el matrigel, el cual se separa del cubre con la ayuda de un raspador estéril y se recoge en un falcon. Tras una hora en hielo, el matrigel se disuelve y se obtienen las células tras una centrifugación de 5 minutos a 1000 rpm. El pellet celular se resuspende en medio completo y se siembra en placas de 60 mm. Tras alcanzar la confluencia fueron seleccionadas por FACS con anticuerpo anti ICAM-2 y el cultivo primario seleccionado se verificó mediante doble marcaje con microscopía confocal tiñendo las células con anti VWF e ICAM-2. Las células empleadas en los experimentos tenían un nivel de pureza que excedía el 99%.

2. Reactivos

Las películas de autoradiografía fueron de Kodak. Las membranas de transferencia de proteínas PVDF eran de Millipore (Iberica, Spain); Los anticuerpos secundarios conjugados-HRP, el sistema de detección de inmunoblots ECL y la proteína A/G sefarosa eran de GE HealthCare (España). La tableta del cóctel de inhibidores de proteasas fue adquirida a Roche (España). El suero de albúmina bovina (BSA), se obtuvo de SIGMA. El optimen y la lipofectamina se adquirieron a GIBCO-BRL. La formalina tamponada del 4%-10% fue adquirida en VWR Internacional. La solución para montar los cubres y realizar técnicas de inmunofluorescencia es de Calbiochem (CN Bioscience, UK). El sustrato fluorescente para medir la actividad de MMP-13 se adquirió a Calbiochem (CN Biosciences, UK); El OCT (OCT Compound containing Tisú-Tek) fue adquirido a Sakura; Los RNAs de interferencia de EMMPRIN fueron obtenidos de Qiagen (Qiagen, GmbH). La anestesia Ketamina, Xilacina de Rompun. La elastasa porcina tipo I fue adquirida de Sigma-Aldrich.

Los anticuerpos primarios fueron adquiridos por los siguientes proveedores: Ratón anti-humano MMP-13 de Calbiochem (IM64L); Cabra anti- humano-MMP13 de Santa Cruz Biotechnologies (D-17) (sc-12363), (Santa Cruz, CA, USA); anti caveolina-1 de BD Transduction Laboratorie (BD, Bioscience, Spain), anti -FLAG (F 3165) de Sigma (St Lous, MS, USA), anti-GST de Santa Cruz Biotechnologies sc 138 mouse, anti ratón monoclonal anti ICAM-2 y VWF de Transduction Laboratorie (BD, Biosciences, Europe); anti mouse-EMMPRIN (AbD Serotec), (St.Lous, MS,USA), mouse-anti Human-EMMPRIN fue donado generosamente por el Prof. Francisco Sánchez Madrid (CNIC, España), Rabbit anti-Nitrotirosina (Upstate, USA), anti iNOS (M-19, sc-650) Santa Cruz Biotechnology, USA. Anti MMP-9 (Ab -1) Mouse mAb (6-6B), Calbiochem; anti MMP-12 (R/D Systems DHB02); anti MMP-2 (R/D Systems MAB903); anti MT1-MMP fue generosamente cedido por la Dra. Alicia García Arroyo.

Los anticuerpos secundarios que se utilizaron fueron: anti- rabbit FITC Dako F0054, anti-Mouse FITC Sigma F1010, anti-Mouse Alexa Fluor 647 de Molecular Probes y anti-goat Alexa Fluor 647 F (ab), Alexa Fluor 488, todos de Molecular Probes. La BisBencimida H33334 (Hoechst) fue adquirida en Sigma.

El compuesto donador de NO, DEA-NO (N,N-Dietilamino)-diacenolato-2-óxido.sal dietilamonio se adquirió de (Alexis Biochemicals, USA). La síntesis de peroxinitrito: ONOO⁻ se sintetizó de la reacción Na NO₂ (1.8 M) con H₂O₂ (2.1 M), como se describe en (Moro, Darley-Usmar et al. 1994; Uttenthal, Alonso et al. 1998), y su concentración fue hallada espectofotométricamente ($\epsilon_{302}=1670\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$).

La síntesis de los péptidos de hemopexina (HP), hemopexina delecionado (HP DEL) y hemopexina Scramble (HP SCRAMBLE) y el péptido Scaffolding Domain de Caveolina -1

(CSD) fueron encargados y sintetizados por Sigma. La neutravidina (Ultralink Immobilized Neutravidine Protein Plus) utilizada para cargar las columnas fue adquirida en Pierce (Rockford, IL). Para la purificación de proteínas se usaron las columnas de afinidad cromatográfica de Ni²⁺, (His Trap Kit, Amersham Pharmacia) y resina de Glutathione Sefarosa, de Amersham Pharmacia.

El péptido inhibidor de proteínas RYEYA fue sintetizado por Sigma (St Louis, MO, USA). El aparato empleado para las medidas de resonancia magnética nuclear fue un espectrómetro Bruker Biospec BMT 47/40 (Bruker, Ettlingen, Alemania).

3. Animales

Los animales de fenotipo salvaje de la cepa C57/BL/6, los animales deficientes para los genes iNOS, ApoE y caveolina-1 (híbridos 129S6/SvEv-C7BL/6-SJL), se obtuvieron de Jackson Laboratory (Bar Harbor, ME). Los ratones carentes de MMP-13 fueron cedidos generosamente por el profesor Stephen Krane y el Profesor López-Otín. Todos los animales se mantuvieron en las mejores condiciones de esterilidad, en habitaciones aisladas en el animalario del CNIC.

4. Muestras humanas de aortas

Estos estudios se han realizado tras la aprobación escrita por el comité ético Institucional y el consentimiento de cada uno de los pacientes. Las muestras humanas de aortas de 18 pacientes con aneurisma de aorta, se obtuvieron de la pared interna de aortas con aneurismas, durante las operaciones. Los tejidos fueron embebidos en parafina para llevar a cabo posteriormente los experimentos de inmunohistoquímica. El análisis morfométrico de los aneurismas se llevó a cabo mediante tomografía computerizada (CT). La información adicional de los pacientes se recoge resumida en la Tabla 1.

MÉTODOS:

1. Preparación de plásmidos

Las construcciones de toda la secuencia codificante de MMP-13 (cds), así como las secuencias parciales de MMP-13 y Caveolina-1 se expresaron en células endoteliales y *E.coli*.

La proteína MMP-13-6X-His fue clonada en PQ30 (Qiagen). Las proteínas de fusión de MMP-13-GST (GST-MMP-13), el dominio hemopexina de MMP-13 (GST-HP), el dominio hemopexina con el dominio de unión a Caveolina-1 deleccionado (GST-HP-CSD-BD-DEL) o

toda la proteína de Cavelina-1 (GST-Cav) fueron expresados en pGEX-4T2 (GE Healthcare). Las proteínas recombinantes se purificaron como se describe más adelante.

Los distintos plásmidos que encierran el cDNA para la formación de las proteínas recombinantes, se clonaron en p3XFLAG-myc-CMV-24 (Sigma); esto da lugar a proteínas recombinantes que llevan en su extremo N-terminal una cola del epítipo FLAG. Se clonó, la proteína EMMPRIN (EMMPRIN-FLAG), así como la proteína total codificante para MMP-13 (MMP-13-FLAG), la parte correspondiente al péptido maduro de la proteína, sin la parte propeptídica (PM-FLAG) y el dominio hemopexina de MMP-13 (HP-FLAG) y la proteína sin la secuencia correspondiente al CSD-BD a Caveolina-1 (HP*-FLAG). La delección de aminoácidos específicos correspondientes al dominio hemopexina de MMP-13, se realizaron con el Kit de mutagénesis dirigida Quick Change Site-Directed Mutagenesis Kit (Stratagene, TX, USA) dando lugar a las proteínas mutantes MMP13 Y338F y MMP13 Y360F.

2. Purificación de proteínas

Las proteínas recombinantes, GST-MMP-13, GST-HP, GST-HP-CSD-BD-DEL, GST-Cav, y MMP13-6X-His fueron purificadas según se indica en Lopez-Rivera, Lizarbe et al. 2005. Los plásmidos fueron transformados en bacterias de expresión de la cepa M15. La expresión de las proteínas recombinantes fue inducida en estos cultivos bacterianos con 1 mM de isopropil β -D- tiogalactósido (IPTG), durante 3 horas a 37°C. Las proteínas recombinantes con un epítipo de 6 histidinas se purificaron usando columnas de afinidad cromatográfica de Ni⁺ (His Trap Kit, Amersham Pharmacia) de acuerdo con las instrucciones de los fabricantes y el resultado de la purificación fue analizado mediante técnicas de Western Blot con anticuerpos específicos anti – MMP13 (Chemicon). Las proteínas recombinantes con un epítipo de GST fueron purificadas en columnas de resina de glutation sefarosa, y el resultado se analizó mediante western usando los anticuerpos primarios precisos.

3. Transfecciones celulares:

Para los experimentos de transfección exógena transitoria con los vectores de expresión que codifican para EMMPRIN-FLAG, CDS-FLAG, PM-FLAG, HP-FLAG, HP*-FLAG y caveolina-GFP, se utilizó Lipofectamina 2000 (Invitrogen TM Life Technologies), siguiendo las instrucciones del proveedor.

Las células BAEC o MAEC se crecieron en placas P6 hasta un 80% de confluencia. En tubos independientes se mezclaron por un lado lipofectamina (2 μ l por pocillo) con 48 μ l de medio de cultivo OPTIMEN (Biowhittaker) sin antibióticos ni suero, y por otro lado la cantidad precisa de plásmido (que oscila desde 0.1 μ g por pocillo hasta 5 μ g por pocillo dependiendo del

plásmido que transfectemos; la dosis óptima de transfección fue analizada para cada plásmido con experimentos de dosis-tiempo) unido hasta un volumen final de 50 µl de optimen de medio de cultivo OPTIMEN. Al cabo de 15 minutos se mezcla el contenido de los dos tubos (dando un volumen final de 100µl por pocillo). Tras ese tiempo se añadió OPTIMEN hasta 400 µl por pocillo y esta mezcla fue añadida a cada pocillo. Las células fueron expuestas durante 3 horas al agente de transfección y pasado ese tiempo, se cambió el medio al natural celular y las células se recogieron tras 3 horas o 24 (en función del plásmido transfectado y el tipo celular). La expresión fue monitorizada por técnicas de inmunofluorescencia por microscopía confocal y western blot con anticuerpos específicos.

4. Inmunofluorescencia

Las proteínas endógenas celulares así como las recombinantes transfectadas, se crecieron en cristales y fueron fijadas con paraformaldehído al 3.5% durante 10 minutos, lavadas por 2 veces con PBS frío y permeabilizadas con metanol frío por 15 minutos. Se lavaron y se incubaron por 1 hora con suero de albúmina bovina (BSA) 3%. A continuación se lavaron con PBS y se incubaron con el anticuerpo primario correspondiente (diluído en PBS+BSA 0.1%), durante 1 hora. Se lavaron 4 veces con PBS para remover todos los restos de anticuerpo primario y se incubaron por 1 hora, con el anticuerpo secundario preciso conjugado con fluorescencia. Las proteínas fueron detectadas con el anticuerpo secundario acoplado a fluorescencia. Los núcleos celulares se tiñeron con Hoechst y las muestras fueron visualizadas en el microscopio de fluorescencia Zeiss Axiovert 200M y en el microscopio de confocal NIKON ECLIPSE TE 2000-U.

5.- Análisis de los niveles de proteínas

Los extractos celulares totales, se prepararon utilizando como solución de lisis RIPA buffer (PBS 1 X, P40 1X, SDS 0.1%, Ácido desoxicolato 0.5%) y el cóctel de inhibidores de proteasas (Mini, EDTA-free Protease Inhibitor Cocktail Tablet) (Roche). Después de la cuantificación proteica de los extractos celulares, la misma concentración fue separada en geles de poliacrilamida-SDS y transferidos a membranas de PVDF (Millipore). Las membranas fueron bloqueadas en leche al 5% en TBS con 0.05% Tween 20 (TBS-T) durante 60 minutos y posteriormente fueron incubadas con anticuerpos específicos contra las diferentes proteínas de interés. Tras la incubación con el anticuerpo secundario correspondiente conjugado a peroxidasa (1 hora, temperatura ambiente), las membranas fueron lavadas por tres veces con TBS-T durante 5 minutos y las bandas correspondientes a las distintas proteínas se detectaron mediante quimioluminiscencia (ECL, Amersham).

6. Inmunoprecipitaciones

Las células BAEC o MAEC transfectadas con las distintas construcciones de MMP-13 fueron lisadas con RIPA y conteniendo los correspondientes inhibidores de proteasas. Los extractos celulares obtenidos se dividieron y se sometieron a inmunoprecipitación mediante agitación orbital, durante 1 hora a 4°C con los anticuerpos anti- FLAG (1:50), anti caveolina-1 (1:50) y anti –IgG (1:50) como control. Para sedimentar los complejos antígeno- anticuerpo se añade proteína A/G Agarosa (20µl, 1:1 en solución de inmunoprecipitación) que se mantiene durante 1 hora a temperatura ambiente. Una vez sedimentados mediante centrifugación y lavados con PBS, los complejos se someten a electroforesis en condiciones desnaturalizantes. Lo mismo se realizó con los sobrenadantes celulares que fueron inmunoprecipitados con anti nitrotirosina (1:50)

7. Ensayos de afinidad de unión con los péptidos sintéticos

Los péptidos sintéticos, hemopexina (CSD-BD), hemopexina delecionado (CSD-BD-DEL) y hemopexina Scramble (CSD-BD-SCRAMBLE), fueron incubados en columnas de Streptavidina-avidina (UltraLink Immobilized NeutrAvidin Protein Plus, PIERCE); una vez se produjo la unión se coincubaron con los distintos extractos de células BAEC y MAEC tratadas con y sin DEA-NO durante una hora en agitación. Se lavaron con PBS por tres veces, con rondas de centrifugación intermedias y se procedió a analizar el resultado obtenido mediante técnicas de western blot con anti-Caveolina-1. El péptido Scaffolding Domain de Caveolina -1 (CSD), fue incubado de la misma manera con Streptavidina-avidina y fue coincubado posteriormente con las proteínas purificas de MMP-13: GST-MMP-13, GST-HP, GST-MMP-13-HP*, con y sin tratar con DEA-NO, durante una hora a 4° C. El resultado fue analizado por western blot anti –GST.

8. Caracterización de la nitración del péptido de Hemopexina por proteómica

El péptido de hemopexina, CSD-BD, (1µg) fue tratado con ONOO⁻ a dosis 100 nM, 500 nM, 100µM, durante 10 minutos a temperatura ambiente. El péptido nitrado fue digerido en solución añadiendo tripsina porcina modificada (grado de secuenciación, PROMEGA), a una concentración final de 0.1 µg. La digestión se efectuó a 37°C durante 30 minutos. Los péptidos tripticos, se inyectaron on-line. En una nano-columna de fase inversa C-18 (Discovery BIO Wide pore, Supelco, Bellafonte, PA) y se analizaron en un gradiente continuo de acetonitrilo. Se

usó un *ca.* 300 nl/min para eluir los péptidos de la columna, a una fuente de ionización de electrospray, acoplada a un espectrómetro de masas de trampa iónica (Esquire HCT, Bruker Daltonics, Bremen, Germany) para la ionización y la fragmentación en tiempo real.

9. Experimentos de silenciamiento de EMMPRIN en células MAEC:

El silenciamiento de EMMPRIN se llevó a cabo según se explica en Lopez-Rivera, Lizarbe et al. 2005. Los siRNA de EMMPRIN fueron trasfectados con Lipofectamina, en dosis de 1 µg en células MAEC crecidas en placas según lo descrito en el apartado de transfecciones celulares; mediante técnicas de western Blot se analizaron los niveles de silenciamiento de EMMPRIN obtenidos.

10. Ensayos de re-endotelización en monocapa

Este ensayo se realizó según está descrito en Lopez-Rivera, Lizarbe et al. 2005. Las células endoteliales se crecieron hasta confluencia en placas de 6 pocillos recubiertas de gelatina al 0.2% y fueron privadas de suero 24 horas antes de llevarse a cabo el ensayo. Las incisiones se realizaron con una punta de pipeta de 1 mm de grosor aproximadamente y se recogieron imágenes en los diferentes tiempos de estudio mediante el microscopio de fluorescencia Axioscop 40 (Zeiss).

El área migrada fue calculada restando el área entre los bordes de la incisión a los distintos tiempos del área inicial medida a tiempo 0. Las microfotografías se realizaron en el microscopio Axioscop 40 (Zeiss).

11. Ensayos in vivo en ratones de reparación de heridas

Los ratones fueron anestesiados mediante una inyección intraperitoneal con Ketamina/Xilacina (La dilución se hace directamente: 0.5ml de xilacina +1.5ml ketamina + 8ml de suero, añadiendo por animal, inyectándose en los ratones en la dosis (PV (g)/100)+0.1ml), el pelo de la parte dorsal dónde se practica la incisión se rasuró y la zona de trabajo se limpió con etanol para proceder en las condiciones más asépticas posible. Se realizaron heridas estrechas externas (una centrada, o dos laterales en función del experimento) en la parte dorsal en la línea media de 5 mm aproximadamente, con un punzón (Accuderm, Ft.Lauderdale, FL, USA). Las heridas se monitorizaron mediante la adquisición de fotografías midiendo el diámetro de las mismas a los distintos tiempos, calculando el área migrada en cada tiempo mediante el programa Image J software. Aquellos ratones que se trataron con el péptido

inhibidor de nitración, fueron anestesiados (a bajas dosis) y se les aplicó el péptido con una concentración de 250 μ M asegurándonos de su reabsorción por la piel.

Se obtuvieron biopsias de las espaldas de los ratones a los distintos tiempos de experimentación para su posterior análisis.

12. Ensayos de medida de actividad de MMP-13

La medida de la actividad enzimática de MMP-13 en los sobrenadantes celulares así como en las pieles de los ratones biopsiadas, fue realizada, mediante el Kit de Calbiochem (CN Bioscience, UK) tal y cómo se indica por el fabricante. Las pieles (previamente disgregadas en IKA-ULTRA-TURRAX), o los sobrenadantes se resuspendieron en un tampón de lisis (Tris 50 mM, NaCl 150 mM, CaCl 5 mM, Brij 5 mM); la medida de la actividad se realiza midiendo la degradación de un sustrato fluorescente por MMP-13 en su forma activa. Este Kit es altamente eficaz y específico para MMP-13 mientras que tiene una baja eficiencia para MMP-1 o MMP-8. Las medidas de la actividad fueron realizadas en el fluorímetro FLUOROSKAN AFCENT de Thermo Labsystems, con los filtros de emisión de 405 nm, y de excitación de 320 nm.

13. Operación de Aneurisma de Aorta en los ratones

Tras anestesiar los ratones mediante una inyección intraperitoneal con Ketamina/Xilacina (La dilución se hace directamente: 0.5ml de xilacina +1.5ml ketamina + 8ml de suero, añadiendo por animal, inyectándose en los ratones en la dosis (PV (g)/100)+0.1ml), se realiza una laparatomía abdominal. A continuación, mediante el empleo de un microscopio quirúrgico, se separa el paquete intestinal y se aísla la arteria aorta abdominal de la vena cava separando la región de aorta sobre la que se induce el aneurisma (sobre las arterias renales y bajo las arterias ilíacas). La arteria se liga temporalmente mediante un hilo de sutura. Se practica una aortomía y se introduce por el orificio practicado un tubo de polietileno PE-26 acoplado a una jeringa para inyectar elastasa pancreática porcina tipo I durante 5 minutos. Como control se inyectó PBS mediante el mismo procedimiento.

14. Inmunohistoquímica

Para el corte de la aortas de ratón, las muestras se recogieron y se embebieron en solución plástica (OCT) almacenándose a -80 °C. Las muestras fueron procesadas mediante su corte al criostato (CM 1900 Leica). La detección inmunohistoquímica, se realizó bloqueando las muestras con una solución de PBS+BSA 0.1% durante 10 minutos, tras lo que se lavan y se incuban por 1 hora con el anticuerpo primario correspondiente. Las muestras se lavan durante 5

minutos con PBS 1X y a continuación se añade el anticuerpo secundario acoplado a HRP, diluido en PBS/BSA 0.1% durante 1 hora. Posteriormente las muestras se lavaron 3 veces durante 5 minutos con PBS y se incuban con DAB 1:100. Tras un último lavado, se preparan las muestras en Aquatex (Merk) y se visualizan en un microscopio de campo claro.

Para las inmunohistoquímicas realizada en pieles de ratón, y en aortas humanas, las muestras se incluyeron en formalina tamponada durante 24 horas, tras lo que se incluyeron en parafina para su corte al microtomo. Las muestras se desparafinaron e hidrataron y posteriormente se realizó un bloqueo durante 7 minutos con HP Block de DAKO. Las muestras se lavaron con PBS 1X, se bloquearon con PBS1X /BSA 0.1% durante 10 minutos y tras lavar de nuevo se añade el anticuerpo primario por 1 hora diluido en PBS1X –BSA 0.1%, se lava y se añade el anticuerpo secundario en PBS1X –BSA 0.1% con DAB durante media hora, para su posterior visualización por microscopía en el microscopio de fluorescencia Zeiss Axiovert 200M.

Las tinciones de los anillos aórticos con el tricómico de Masson se realizaron sobre cortes de las aortas de ratones, realizados en parafina y se usó el Kit de MASSON-GOLDNER-Färbekit de MERCK.

15. Resonancia Magnética nuclear y Angiografía

Los ratones se anestesiaron con 3% Isoflurano/O₂ y se mantuvieron anestesiados con 1.5% de Isoflurano/O₂. Para monitorizar al ratón y acompasar la respiración a la adquisición de imágenes, se les acopló una sonda. La adquisición de imágenes se realizó por un espectrómetro Bruker Biospec BMT 47/40 (Bruker, Ettlingen, Alemania) de 4.7 T, equipado con un sistema de gradiente activamente apantallado de 11.6 cm., capaz de alcanzar un gradiente de 200mT/m y permitir el ascenso en 80 μ s. Se utilizó una sonda de radiofrecuencia de superficie con forma de 4 cm de ancho y 10 cm de largo construida en el laboratorio. Se ajustó la homogeneidad global y se tomaron 3 imágenes en las direcciones axial, sagital y coronal usando secuencias de eco de espin potenciadas en T1 acompasadas con (TR/TE=200/10 ms) que sirven para la localización de los experimentos posteriores. Se adquirieron imágenes de eco de espin potenciadas en T1 acompasadas con la respiración en la dirección sagital. Los tiempos de repetición variaron entre 500 a 700 ms dependiendo del ritmo respiratorio de cada animal, y los tiempos de eco (TE) fueron de 15 ms. Se tomaron 15 imágenes del plano sagital de 1.0 mm con un campo de vista (FOV) DE 4X2 cm² y un tamaño de matriz de 256x128. Las imágenes adquiridas en el plano axial acompasadas con la entrada de la respiración se tomaron usando los mismos parámetros que los de arriba con un FOV de 3X3 cm y una matriz de 256x192. Se obtuvieron 24 imágenes y los datos fueron rellenados de ceros para obtener imágenes de 256x256 pixeles.

Para la angiografía de la resonancia magnética, se utilizó una secuencia de eco de gradiente con compensación de flujo con los siguientes parámetros: TR= 45 ms; TE= 10 ms; ángulo de excitación = 80°; tamaño de adquisición de la matriz= 256x128; FOV= 3.5X1.75 cm²; número de cortes= 64, 0.5mm/corte; los cortes se solaparon 0.1mm, con un FOV en la dirección del corte de 2.57 cm.

Los datos se procesaron con el paquete de Software de Para Vision (Bruker, Ettlingen, Alemania). Los datos fueron primero interpolados para obtener voxels isotrópicos de 137x137x137μm³). La matriz adquirida era de 256x128x64 cubriendo un FOV DE 3.5X1.75X2.57 cm³. El resultado de la matriz se interpoló a 256x128x188 par obtener una resolución de 137x137x137μm³. Para obtener las vistas 3D de los datos interpolados se aplicó el algoritmo de proyección de la intensidad máxima (MIP).

4. RESULTADOS

4. RESULTADOS

4.1. BLOQUE I

El NO induce el movimiento endotelial mediante la activación de MMP-13, disociándola de Caveolina-1.

4.1.1 Determinación molecular del dominio de interacción MMP-13/Caveolina -1

MMP13 interacciona con Caveolina-1 en células endoteliales

En estudios anteriores llevados a cabo en nuestro laboratorio, se puso de manifiesto que el NO es capaz de inducir la expresión y la actividad de MMP13 en células endoteliales de aorta bovina (BAEC) y murina (MAEC) (Lopez-Rivera, Lizarbe et al. 2005). Para caracterizar en profundidad la base molecular de la activación proteolítica ejercida por el NO mediante el uso de técnicas de inmunofluorescencia e inmunoprecipitación de fracciones caveolares determinamos la presencia de MMP-13 en las caveolas de las células endoteliales (BAEC) y su colocalización con Caveolina-1 (Lopez-Rivera, Lizarbe et al. 2005), Fig 4A, 4B, 4D, 4E), tanto en BAEC (Fig 1A) como en células MAEC provenientes de ratones salvajes para Caveolina-1 (WT) utilizando como controles negativos MAEC provenientes de ratones deficientes para dicho gen (KO) (Fig 1B).

Para verificar estos resultados, procedimos a la expresión de MMP-13 y sus distintos dominios estructurales (cuyas secuencias de DNA fueron clonadas en el vector p3X-FLAG-myc-CMV-24) obteniendo proteínas recombinantes de MMP-13 con un epítipo FLAG en su extremo N-terminal, como estrategia para poder discriminar entre la expresión endógena de MMP-13 y las distintas formas recombinantes de la misma. Al expresar en BAEC (Fig 1C) y en MAEC (Fig 1E) la secuencia codificante completa de MMP-13 (MMP-13-FLAG) se observó tanto la colocalización de esta con la Caveolina-1 endógena, así como con Caveolina-1 expresada de forma exógena. Al co-transfectar células BAEC con Caveolina-1-GFP y la forma MMP13-FLAG recombinante (Fig 1D) se encontró la misma colocalización. Los lisados celulares que expresan MMP-13 ectópica fueron inmunoprecipitados con anticuerpo anti Caveolina-1 y anti FLAG observando tanto para las células MAEC como para las BAEC colocalización entre ambas proteínas (Fig1F, 1G). Este conjunto de resultados apuntan directamente a que **MMP-13 colocaliza en las caveolas de las células endoteliales con Caveolina-1.**

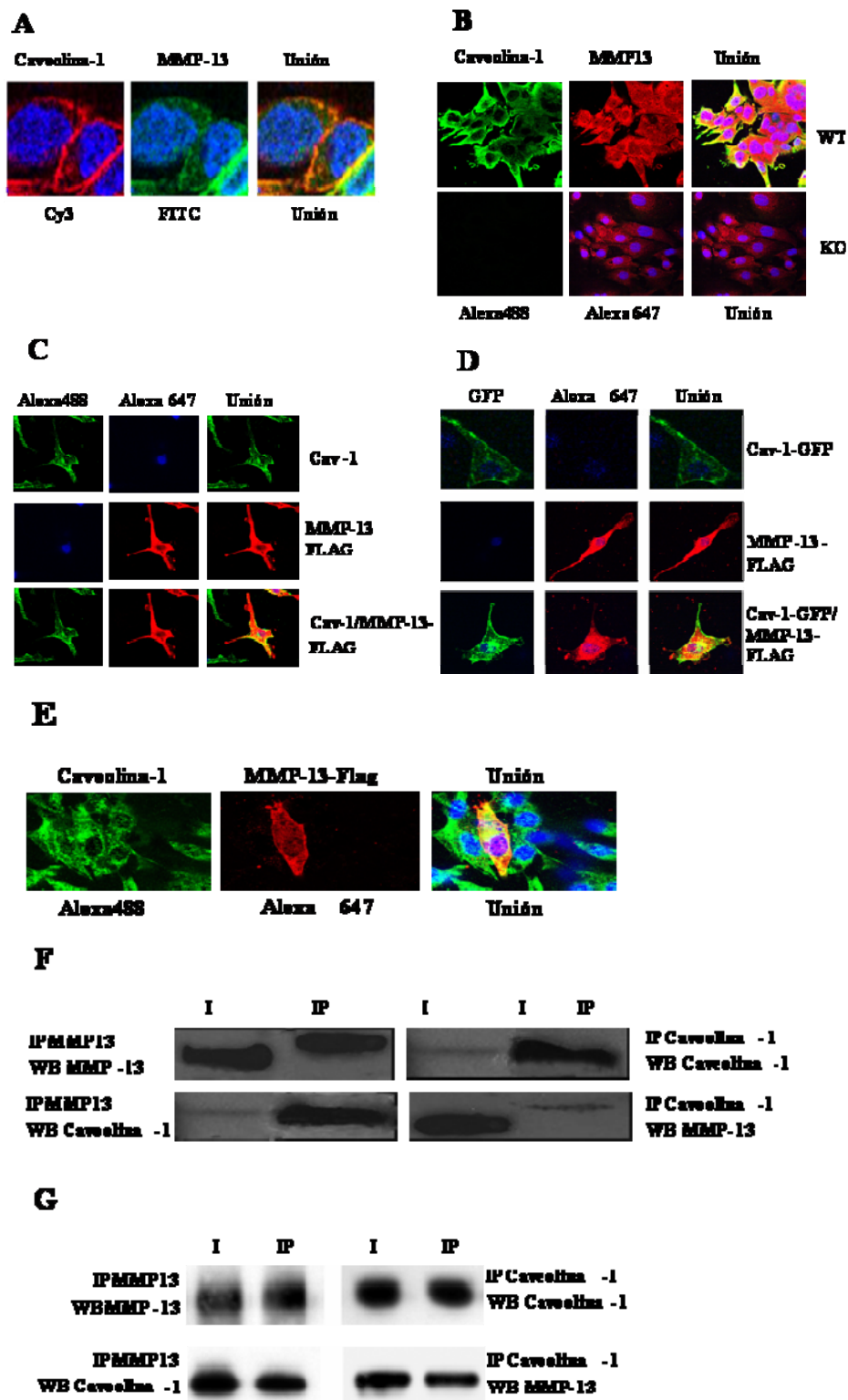


Fig. 1. MMP-13 colocaliza con Caveolina-1 en las membranas de las células endoteliales. A) Microscopía confocal mostrando la expresión de Caveolina-1 (rojo) y MMP-13 (verde) en células BAEC. El panel unión muestra colocalización en amarillo, de las dos proteínas. B) Microscopía confocal mostrando colocalización en amarillo entre MMP-13 endógena (rojo) y Caveolina -1 endógena (verde), en células MAEC WT y KO Caveolina-1. C) Microscopía confocal mostrando colocalización en amarillo entre la proteína recombinante transfectada en las células BAEC, MMP-13-FLAG (rojo) y Caveolina-1 endógena (verde) en células BAEC. D) Microscopía confocal mostrando colocalización en amarillo entre las dos proteínas recombinantes transfectadas en las células BAEC: MMP-13-FLAG (rojo) y Caveolina-1-GFP (verde) en células BAEC. E) Microscopía confocal mostrando colocalización en amarillo entre la proteína recombinante transfectada en células MAEC, MMP-13-FLAG (rojo) y Caveolina-1 endógena (verde). F) Experimentos de inmunoprecipitación cruzada, en células MAEC, para MMP-13-FLAG y caveolina endógena G) Experimentos de inmunoprecipitación cruzada, en células BAEC entre MMP-13-FLAG y caveolina-1 endógena

MMP-13 interacciona con Caveolina-1 a través del dominio carboxi-terminal

Para analizar con un mayor nivel de complejidad la región de MMP13 que se encuentra interaccionando con Caveolina-1, generamos las proteínas recombinantes correspondientes a la forma activa de MMP-13 (péptido maduro, PEPT MAD, (PM)) y al dominio de hemopexina de la región C-terminal de la metaloproteasa (HP), por haberse descrito este último como un dominio de interacción proteína-proteína (Knauper, Cowell et al. 1997), detectando la interacción de ambas proteínas recombinantes con Caveolina-1 endógena mediante técnicas de inmunofluorescencia en células BAEC (Fig 2A) y en células MAEC (Fig 2D). La interacción del dominio HP de MMP-13 con Caveolina-1 la verificamos mediante microscopía confocal en BAEC en las que expresamos de forma exógena Caveolina-1-GFP encontrando la misma colocalización con la proteína recombinante HP-FLAG (Fig 2B).

La asociación directa entre el dominio HP y Caveolina-1 la confirmamos mediante técnicas bioquímicas de inmunoprecipitación con lisados de células BAEC transfectadas con los distintos dominios de la metaloproteasa y Caveolina-1, usando anticuerpos anti-FLAG y anti-Caveolina-1 (Fig 2C).

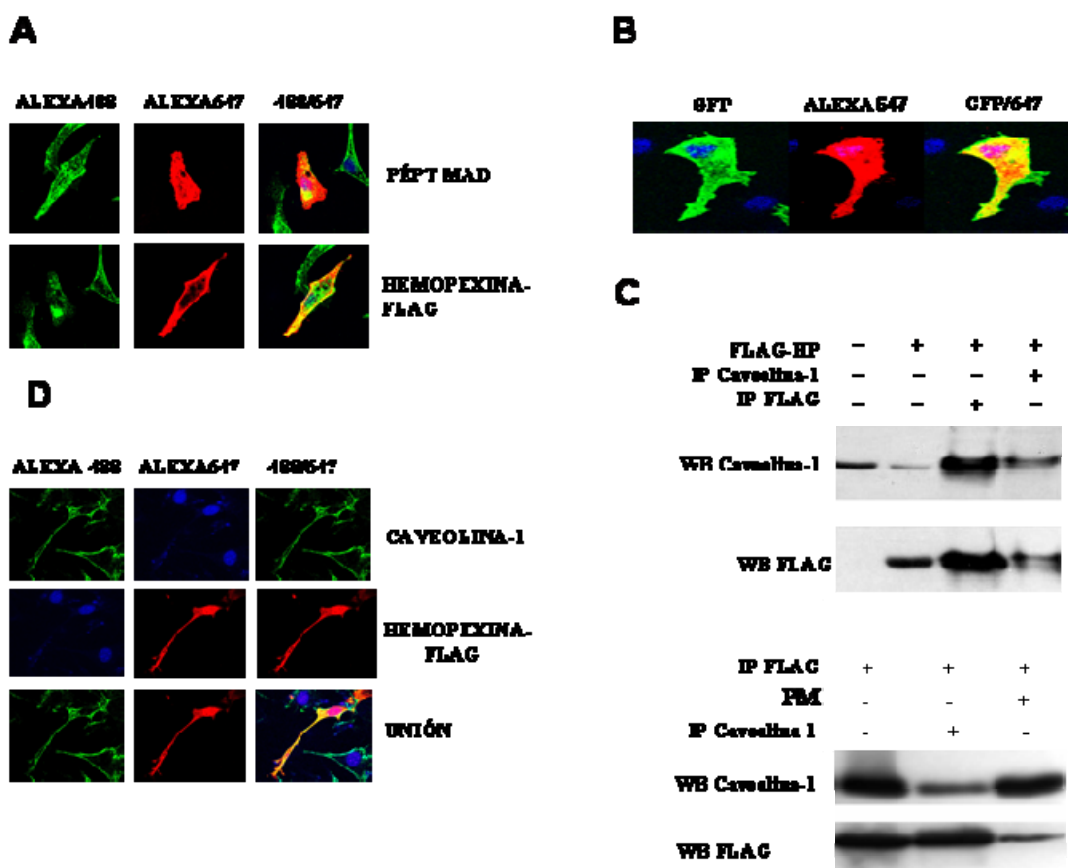


Fig 2. MMP-13 interacciona con Caveolina-1 a través de su dominio carboxi-terminal A) Microscopía confocal mostrando colocalización de los dominios PM y HP-FLAG (rojo) transfectados en células BAEC, con caveolina-1 endógena (verde). B) Colocalización de los plásmidos doblemente transfectados, HP-FLAG (rojo) con Caveolina-GFP (verde) en células BAEC. C) Lisados de células BAEC transfectados con los dominios PM-FLAG y HP-FLAG e IP con anticuerpo anti FLAG y anti Caveolina-1. D) Microscopía confocal mostrando colocalización del dominio HP-FLAG con Caveolina-1 endógena en células MAEC.

4.1.2. Análisis del efecto del NO en la interacción del complejo MMP-13/Caveolina-1, durante los procesos de migración celular.

El NO rompe la interacción entre MMP-13 y Caveolina-1

Para explorar si el NO tiene algún efecto sobre el complejo MMP-13/Caveolina-1 llevamos a cabo distintas aproximaciones experimentales. En un primer nivel, procedimos a la expresión en *E.coli* de MMP-13 y posterior purificación de la forma recombinante anclada a un epítipo de 6 residuos de histidina en su extremo N-terminal (MMP-13-6X-His). Cuando nosotros incubamos esta proteína con extractos de células BAEC con y sin tratar con el donador de óxido nítrico DEA-NO a una concentración de 100 μ M, hallamos un enriquecimiento de Caveolina-1 en los extractos tratados con el vehículo en comparación con aquellos tratados con DEA-NO (Fig 3A; (Lopez-Rivera, Lizarbe et al. 2005)). Este efecto lo verificamos al expresar y purificar Caveolina-1 anclada en su extremo N-terminal a un epítipo de glutatión S-transferasa (GST) (GST-Caveolina). Cuando incubamos de forma directa MMP-13-6X-His con GST-Caveolina, la presencia del DEA-NO fue suficiente como para inhibir la interacción entre las dos proteínas (Fig 3B, (Lopez-Rivera, Lizarbe et al. 2005)). Para analizar sobre qué proteína el NO es capaz de ejercer este efecto, incubamos previamente a los ensayos de inmunoprecipitación MMP-13-6XHis o GST-Caveolina con DEA-NO, detectando que el tratamiento de Caveolina-1 con DEA-NO no afecta la unión con MMP-13, mientras que la incubación previa de MMP-13-6XHis con el donador, disminuye significativamente la detección del complejo entre ambas proteínas. (Fig 3C, (Lopez-Rivera, Lizarbe et al. 2005)).

A un segundo nivel, procedimos a la expresión exógena de MMP-13 y su dominio HP (ambas proteínas con un epítipo de FLAG) en células BAEC tratadas con o sin el donador DEA-NO a distintas concentraciones, detectando tanto por inmunofluorescencia como mediante técnicas de inmunoprecipitación, una disrupción de los complejos MMP-13-FLAG/Caveolina-1 (Fig 3D, 3E) y HP-FLAG/Caveolina-1 (Fig 3F, 3G) a la menor de las dosis del donador empleadas (Fig3D, 3E).

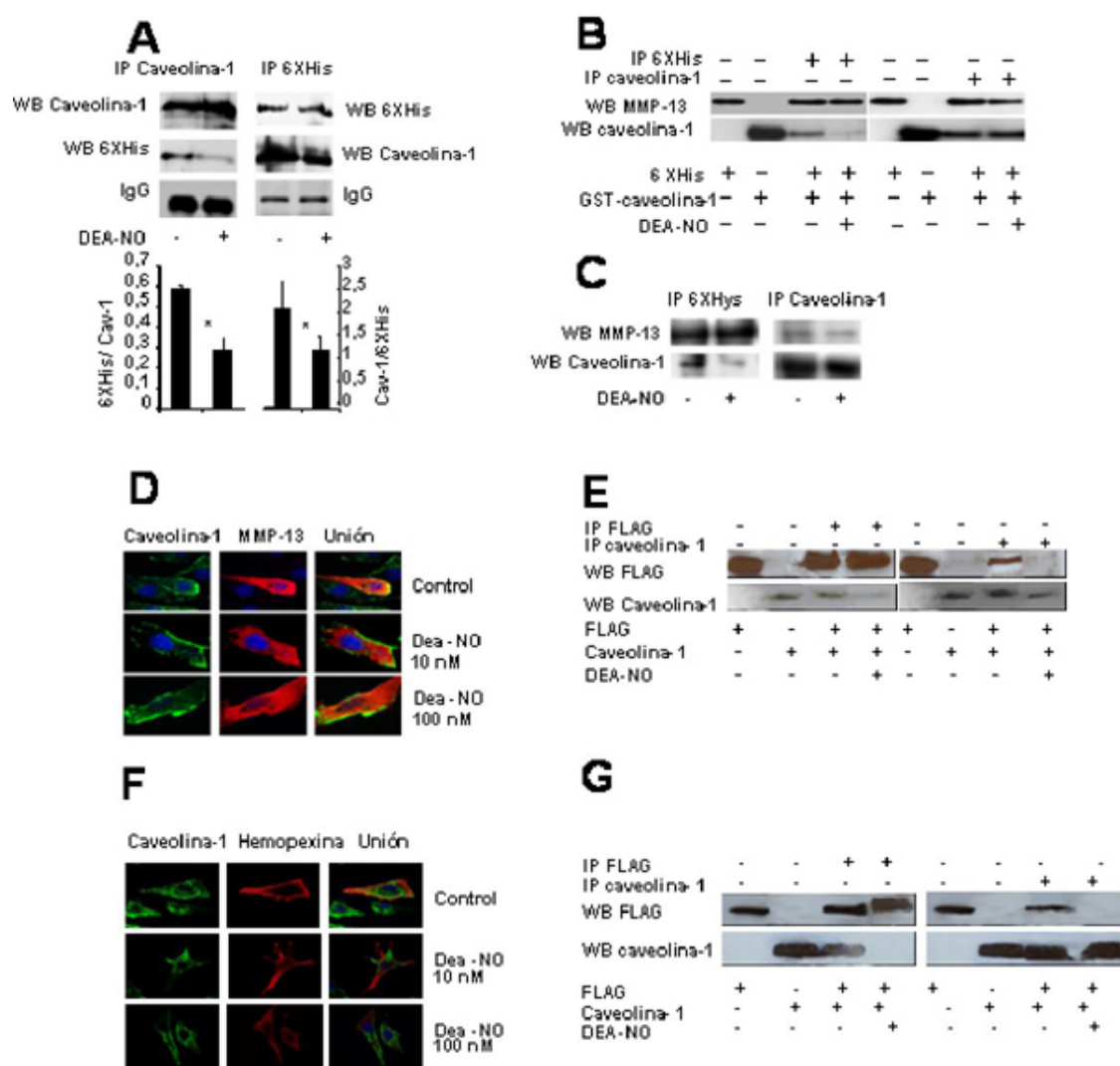


Fig 3. NO rompe la interacción entre MMP-13 y Caveolina-1. A) Experimentos de co-inmunoprecipitación de MMP-13 purificada incubada con extractos de BAEC por 16 horas a 4 grados y tratadas con DEA-NO o el vehículo por dos horas. B) IP de proteínas recombinantes, MMP-13-6X-His, GST-Caveolina tratadas con DEA-NO por una hora. C) MMP-13-6X-His o GST-Caveolina fueron pretratadas con DEA-NO 100µM por una hora y después unidas a MMP-13-6X-Hys o GST-Caveolina respectivamente. Posteriormente fueron IP. D) Microscopía confocal de MMP-13-FLAG (rojo) y caveolina-1 (verde) en células BAEC con y sin tratar con DEA-NO a distintas dosis. El panel unión muestra colocalización (amarillo) o ausencia de la misma (verde). E) Lisados de células BAEC transfectadas con MMP-13-FLAG con y sin tratar con DEA-NO fueron CO-IP con anticuerpo anti FLAG y anti Caveolina endógena en extractos de BAEC con y sin tratar con DEA-NO. F) Microscopía confocal de BAEC transfectadas con HP- FLAG (rojo) viendo su posible colocalización con caveolina-1 (verde) en tratamientos con y sin DEA-NO (10 nM-100nM.) G) CO-IP de extractos de células BAEC transfectadas con HP-FLAG y tratadas con DEA-NO (100 nM).

4.1.3. Determinación molecular de la secuencia de interacción de MMP-13 con el CSD de Caveolina-1 en el complejo MMP-13/Caveolina-1.

Secuencia consenso de reconocimiento de MMP-13 en su interacción con Caveolina-1.

Caveolina-1 interacciona con distintas proteínas a través de un dominio denominado “scaffolding” (CSD) de la misma, mientras que se ha propuesto que las proteínas que tienen capacidad de interacción con la Caveolina-1, lo pueden hacer a través de la siguiente secuencia

consenso: **ØXØXXXØ**, donde Ø supone cualquier aminoácido aromático y X supone cualquier aminoácido. Haciendo un estudio de la secuencia de MMP-13 hemos sido capaces de localizar una posible secuencia de este tipo para la unión a Caveolina-1, precisamente en el dominio hemopexina (HP) de la misma (Fig 4A).

Con el objeto de determinar si efectivamente MMP-13 interacciona con Caveolina-1 a través de esta región, procedimos a la expresión del dominio HP de MMP-13 con y sin el fragmento delecionado (Fig 4A, panel derecho, la zona deleccionada es la que se encuentra entre la Y338 y la Y360. Esta proteína se llamó HP*-FLAG). Tanto mediante inmunofluorescencia como por inmunoprecipitación hemos comprobado que mientras que el dominio de hemopexina interacciona con Caveolina-1, la construcción que expresa el fragmento delecionado es incapaz de unirse a Caveolina-1 con la misma intensidad (Fig. 4B, 4C), lo cual indica que MMP-13 se está uniendo a Caveolina-1 a través de esa secuencia

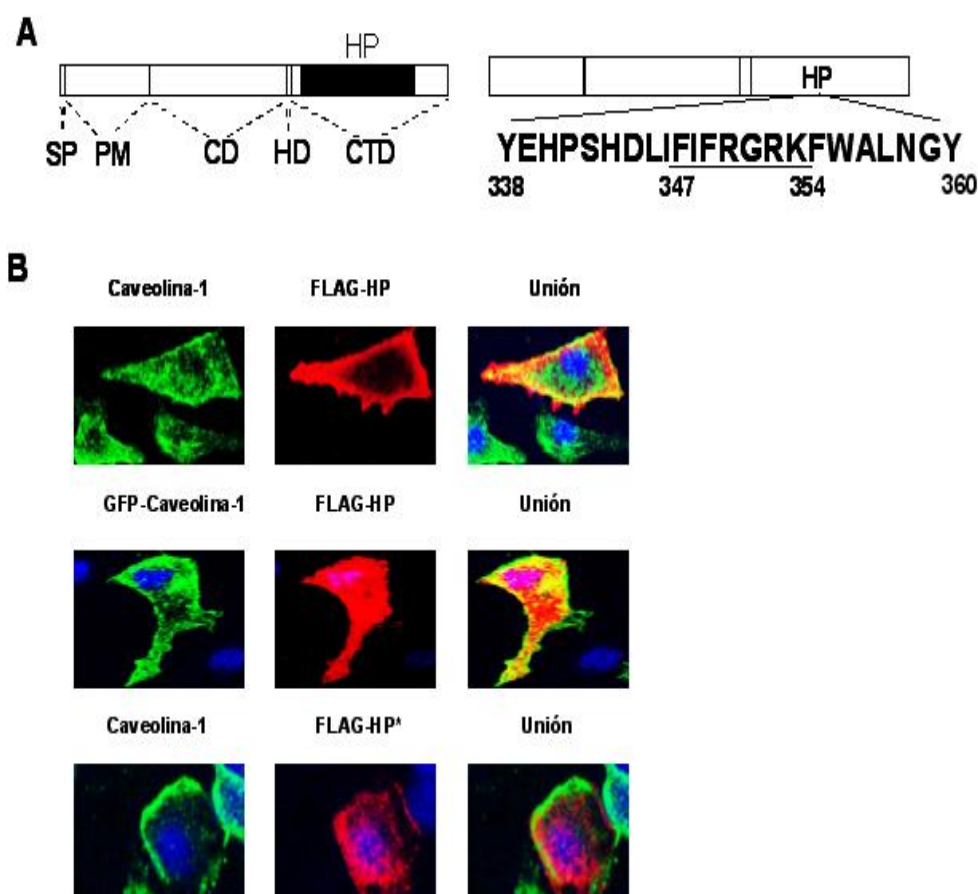


Fig. 4. Secuencia consenso de reconocimiento de MMP-13 en su interacción con Caveolina-1. A) Dominios de la proteasa. SP: Péptido Señal. PM: Péptido Maduro. CD: Dominio Catalítico. HD: Dominio Hinge (visagra). CTD: Dominio Catalítico. Dentro del mismo se localiza el dominio Hemopexina (HP), que contiene la posible secuencia de unión a caveolina-1 de MMP-13 (panel derecho, secuencia aminoacídica situada entre Y338 y Y360, subrayada). B) Panel Superior: Microscopía confocal de células BAEC transfectadas con el dominio Hemopexina-FLAG (rojo) y Caveolina-1 (verde). El panel Unión muestra la colocalización entre las dos proteínas. Panel Central: Microscopía confocal que muestra colocalización (amarillo) entre el dominio HP-FLAG y Caveolina-GFP (ambas proteínas transfectadas en células BAEC). Panel Inferior: Microscopía confocal de células BAEC transfectadas con Hemopexina delecionada (HP*-FLAG) en la posible secuencia de unión a caveolina-1, eliminado entre Y338 y Y360 (rojo) y Caveolina-1 (verde) mostrándose en el panel Unión la falta de colocalización entre ambas proteínas.

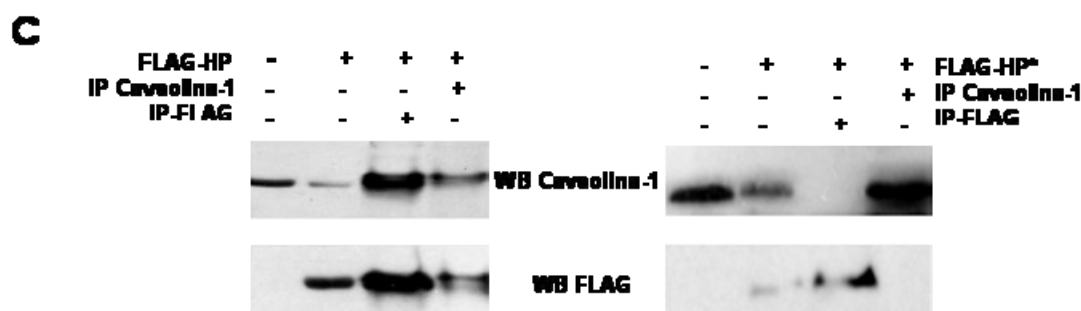


Fig. 4. Secuencia consenso de reconocimiento de MMP-13 en su interacción con Caveolina-1. C) CO-IP de lisados de células BAEC transfectadas con el plásmido HP-FLAG y HP* -FLAG, con caveolina-1 endógena.

Caveolina-1 se une al dominio CSD de unión a caveolina-1 (CBD) localizado dentro del dominio Hemopexina de MMP-13.

Para demostrar que la unión de las dos proteínas se producía exactamente en esta secuencia, sintetizamos los péptidos correspondientes a la secuencia de unión a Caveolina-1 (HP), a la secuencia de unión deletada en el supuesto dominio de unión a caveolina-1 (HP-DEL), y un péptido con los mismos aminoácidos de la posible unión, aunque con otra ordenación (HP-SCRAMBLE) (Tabla 1). Estos péptidos se sintetizaron anclados a biotina en su extremo carboxi-terminal para ser utilizados en ensayos de “pull down”, en columnas de afinidad a estreptavidina. Tras el anclaje de los péptidos a las columnas pasamos a través de las mismas un extracto de células BAEC, incubado o no previamente con el donador de NO, DEA-NO (100 nM) y además de forma paralela, los mismos experimentos se realizaron con lisados de MAEC. Tras el lavado y elución de las proteínas de las columnas, fuimos capaces de detectar Caveolina-1 en las columnas en las que pasamos tanto extractos de BAEC como de MAEC y tenían fijados a las mismas el dominio de unión a Caveolina-1. Para el resto de péptidos no detectamos unión, o esta resultó extremadamente débil (Fig 5A, 5B). Además los lisados pretratados con DEA-NO parecían estar disminuyendo la unión entre las dos proteínas.

Con el objetivo de confirmar que efectivamente la secuencia propuesta es la que MMP-13 utiliza para el anclaje a Caveolina-1, expresamos y purificamos no sólo la secuencia completa de MMP-13 (GST-MMP-13), sino también el dominio hemopexina y el mismo dominio deletado en la región de unión a caveolina (denominados GST-HP y GST-HP-CSD-BD-DEL) respectivamente. Así mismo, sintetizamos el péptido “scaffolding”(CSD) de Caveolina-1 y lo anclamos de forma similar a columnas de estreptavidina. Las distintas proteínas recombinantes las pasamos por columnas con el CSD anclado a las mismas y tras los lavados y las eluciones, comprobamos que la proteína GST-HP-CSD-BD-DEL carece de la capacidad de unirse al CSD de Caveolina-1. Además, de la misma forma que en el caso anterior,

la incubación de las proteínas recombinantes con el donador DEA-NO tiene como consecuencia la inhibición de la unión al dominio de Caveolina-1 (Fig 5C).

El conjunto de resultados obtenidos pone de manifiesto los **dominios de unión de MMP-13** y Caveolina-1, así como el **efecto inhibitorio del DEA-NO** en la unión de las proteínas por esas regiones específicas.

| |
|---|
| TABLA 1 |
| PÉPTIDOS BIOTINILADOS MMP-13 |
| CSD-BD: A Y E H P S H D L I F I F R G R K F W A L N G Y D |
| CSD-BD-DEL: A Y E H P S H D L I W A L N G Y D |
| CSD-BD-SCRAMBLE: A Y E H P S H D L I R R G F F F K I K W A L N G Y D |
| PÉPTIDO DE CAVEOLINA-1 BIOTINILADO |
| CSD: F H G I W K A S F T T F T V T K Y W F Y R L L |

Tabla 1: Los péptidos sintetizados biotinilados son: CSD-BD (péptido correspondiente a los residuos 337-361 de MMP-13, que contiene lo 8 aminoácidos putativos de unión a Caveolina-1 FIFRGRKF del dominio hemopexina.); CSD-BD-DEL (versión del péptido CSD-BD con los 8 aminoácidos delecionados); CSD-BD-SCRAMBLE (los mismos aminoácidos que CSD-BD pero cambiando el orden). CSD: Dominio Scaffolding de unión de Caveolina-1.

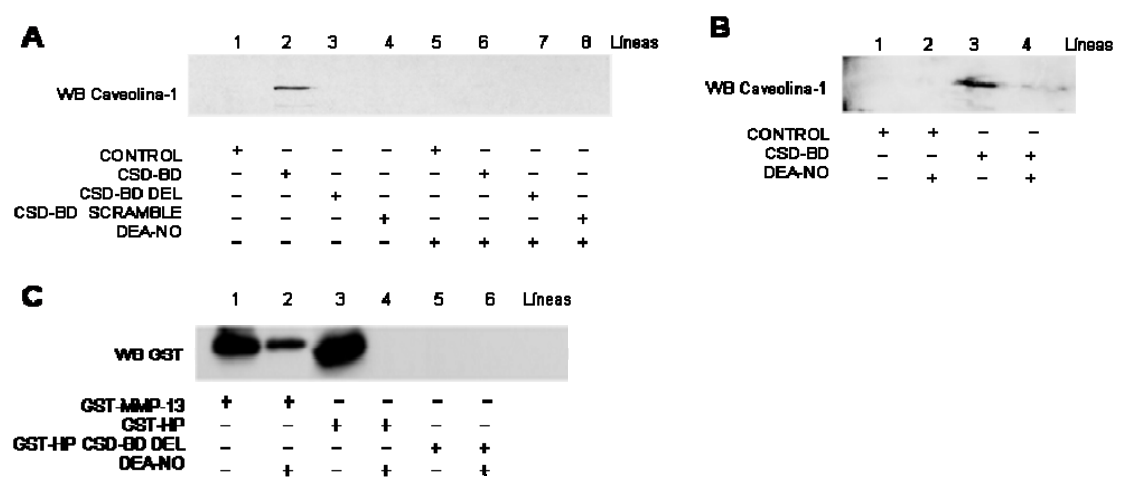


Fig 5. Caveolina-1 se une al dominio CSD de unión a Caveolina-1 localizado dentro del dominio Hemopexina de MMP-13. A) Afinidad de unión de lisados de células BAEC tratados y sin tratar con DEA-NO 100 nM. Los lisados se pasan a través de columnas de neutroavidina a las cuales se encuentran fijadas los péptidos sintéticos biotinilados. Control: columna vacía sin unión del péptido. Donde está indicado los péptidos de MMP-13 de preincubaron con DEA-NO 100 nM. Después de lavar las columnas, las proteínas que se unieron a la columna fueron eluidas y reveladas con un anticuerpo anti caveolina-1 (n=3). B) Afinidad de unión de lisados de células MAEC al CSD-BD (n= 3). Experimento realizado de la misma manera que en A. C) Afinidad de unión de proteínas recombinantes purificadas N-terminal GST-proteínas de fusión de CDS-MMP-13 (GST-MMP-13), del dominio Hemopexina de MMP-13 (GST-HP) y de una variante que carece de los 8 aminoácidos de unión al CSD de Caveolina-1 (GST-HP CSD-BD-DEL). Las proteínas de fusión GST se pasaron a través de columnas de neutroavidina que tenían fijadas el péptido biotinilado correspondiente al CSD de Caveolina-1. Donde corresponde en la figura, las proteínas recombinantes fueron preincubadas con 100 nM de DEA-NO. Se lavaron las columnas y las proteínas fijadas se eluyeron y fueron reveladas en un western con un anticuerpo anti-GST.

4.1.4. Base Molecular del efecto del NO sobre la activación de la proteasa durante los procesos de reparación de herida.

La nitración de la tirosina de MMP-13 mediada por el NO induce la secreción de MMP-13 y la migración de las células endoteliales durante experimentos de Wound Healing.

Los ensayos anteriormente mostrados apuntan de forma directa a un posible mecanismo post-traducciona ejercido por el NO en la ruptura del complejo MMP-13/Caveolina-1 sobre el dominio Hemopexina de MMP-13. De entre las distintas modificaciones que el NO es capaz de realizar sobre las proteínas, la nitración en residuos de tirosina podría ser un objetivo claro a explorar, al contener el dominio de unión a Caveolina-1 dos restos de dicho aminoácido flanqueando dicha secuencia (posiciones Y338 y Y360 de la estructura primaria de MMP-13). Como primera aproximación, y con el mero objetivo inicial de saber si MMP-13 y el dominio hemopexina presentan la capacidad para sufrir nitración, realizamos un experimento de nitración in vitro de las proteínas recombinantes de MMP-13 (GST-MMP-13 y GST-HP), tratando las proteínas con ONOO⁻ (50 mM), durante 2 horas y detectando por inmunoblot las mismas con un anticuerpo anti-nitrotirosina (Fig 6A). Ante este resultado evaluamos la capacidad de los dos residuos de tirosina de ser modificados por el NO, para lo cual repetimos el mismo tipo de ensayo, no con las proteínas sino con los péptidos que habíamos sintetizado previamente, detectando la capacidad efectiva del NO para modificarlos (Fig 6B).

Ante la evidencia de la nitración in vitro, llevamos a cabo un ensayo funcional con el objeto de poder determinar la posible relevancia fisiológica de la nitración de MMP-13, para lo cual realizamos ensayos de migración de las células endoteliales en ensayos de reparación de heridas. Sobre una monocapa de células BAEC practicamos una incisión longitudinal, monitorizando posteriormente el tiempo invertido por las células endoteliales en cubrir la superficie desnuda. Vimos como el DEA-NO (100 μM), estimula la migración de las células endoteliales de manera dependiente en el tiempo, y este efecto era prevenido en presencia de un péptido inhibidor de la nitración de proteínas (RYEYA) (Fig 6C). Medimos la actividad MMP-13 en los sobrenadantes celulares de la monocapa endotelial herida, y vimos un aumento de actividad de la proteína MMP-13 secretada, tanto en aquellas células tratadas con DEA-NO (100 μM) como en las células que se trataron con el control positivo de la nitración de las proteínas, peroxinitrito ONOO⁻ (100 nM) (Fig 6D). Lo más importante a resaltar es que sobre los mismos sobrenadantes de las células tratadas con ONOO⁻ (100 nM) mediante ensayos de inmunoprecipitación con anticuerpos anti-MMP-13 y anti-nitrotirosina, detectamos MMP-13 nitrada en concentración creciente en el tiempo (Fig 6E). De todos los resultados obtenidos podemos concluir que MMP-13 es modificada post-traduccionalmente por el NO durante la reparación de heridas, correlacionando de forma directa la mayor migración celular con el incremento de MMP-13 en el espacio extracelular y su estado nitrado.

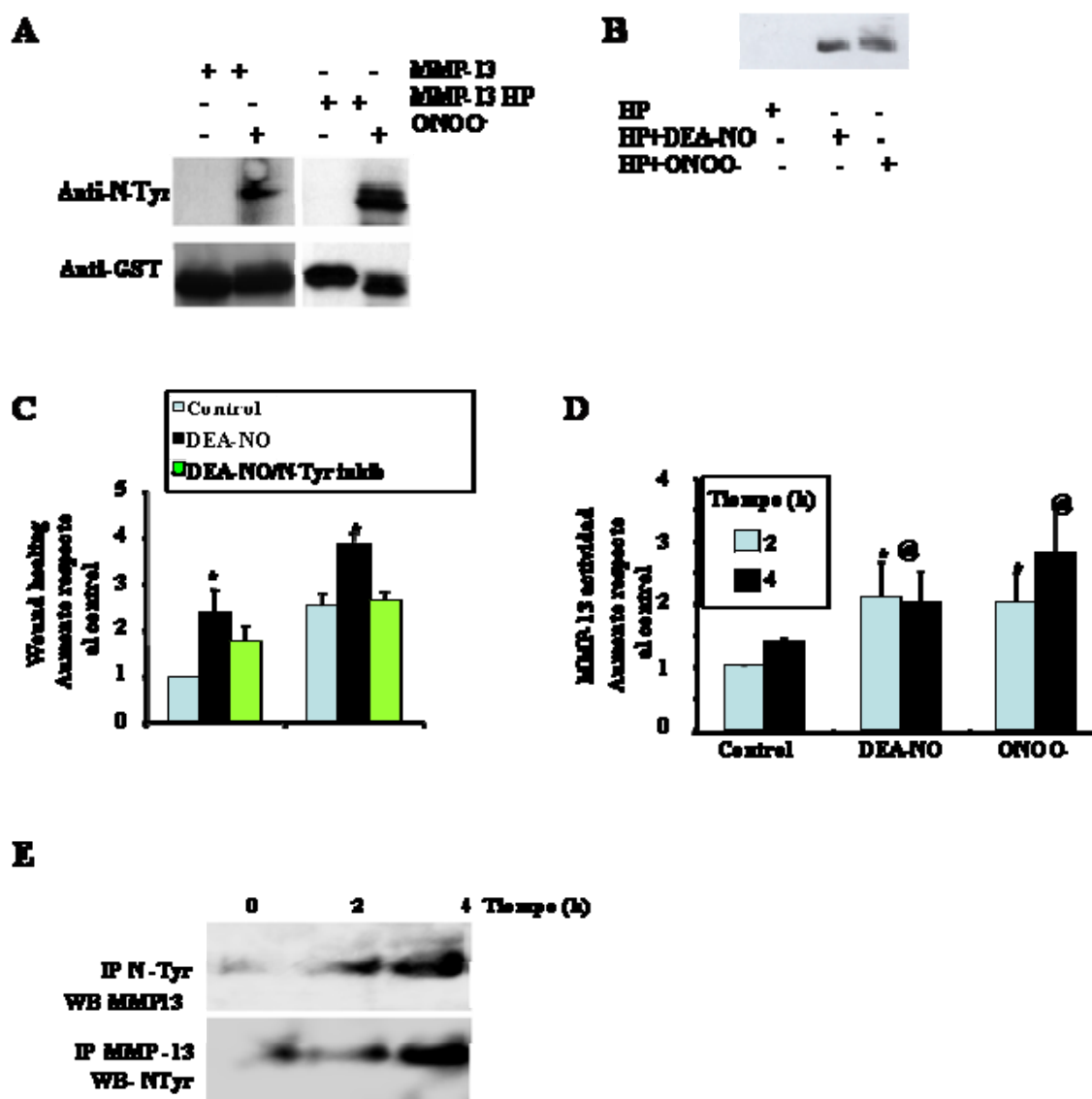


Fig 6. La nitración de las tirosinas de MMP-13 mediada por el NO induce la secreción de MMP-13 y la migración de las células endoteliales durante experimentos de Wound Healing. A) Nitración de GST-MMP-13 y GST-HP. Las proteínas de fusión fueron tratadas con ONOO⁻ (50 mM) durante 2 h y después se realizó un western blot anti nitro-tirosina (panel superior) y anti-GST (panel inferior)(n=3) B) Nitración in vitro del péptido de Hemopexina biotinilado tratado con DEA-NO(100 μM) y ONOO⁻ (100 μM) e inmunoblot con anticuerpo anti-nitrotirosina. C) Ensayos de Wound Healing (ver métodos) en células BAEC tratadas con DEA-NO (100 μM) y el péptido inhibidor de nitración de tirosinas (RYEYA) (Inhibidor de N-Tyr). Se monitorizó la migración de las células 4 horas. Los resultados están expresados como aumento en la migración con respecto a los controles en cultivo (n=3, mean ± SD; *p<0.05 vs control). D) Medida de la actividad de MMP-13 en los sobrenadantes de las células BAEC heridas tratadas con 100 μM DEA-NO o ONOO⁻ (100 nM) (n=3, mean ± SD; *p<0.05 vs control 2 h después de la herida; @ p<0.05 vs control 4 h después de la herida. E) Cross-coimmunoprecipitaciones de sobrenadantes de los cultivos de células BAEC tratadas con DEA-NO como en C. Los sobrenadantes de los cultivos fueron coimmunoprecipitados con anticuerpo anti nitro-tirosina y las proteínas se detectaron por inmunoblot (n=3).

La Tirosina 338 de MMP-13 es necesaria para la unión a caveolina-1 y es una diana del NO.

Una vez conocida la nitración de MMP-13 por el NO, tanto in-vitro como sobre la forma endógena de la proteína ante un proceso como es la reparación endotelial y con el objeto de esclarecer la base molecular de la modificación post-traducional y la relevancia sobre la

unión a Caveolina-1, nos propusimos intentar averiguar si las tirosinas que flanquean el dominio de unión a Caveolina-1 eran fundamentales para la interacción entre las dos proteínas. Para ello, generamos proteínas mutantes en los residuos de tirosina (mutadas por fenilalanina, mediante ensayos de mutagénesis dirigida), que flanquean la secuencia consenso de unión de MMP-13: MMP-13-Y338F y MMP-13-Y360F (Fig 7A esquema superior). Se llevaron a cabo experimentos de transfección en células BAEC y posteriormente realizamos experimentos de coimmunoprecipitación con anticuerpos anti-FLAG y anti-Caveolina-1, detectando que mientras que las formas salvaje de MMP-13 y el mutante MMP-13-Y360F, interaccionan con Caveolina-1, el mutante MMP-13-Y338F ha perdido la capacidad de interacción con dicha molécula (Fig 7A panel central), hecho que apunta directamente a la **tirosina 338** del dominio Hemopexina de MMP-13 como **aminoácido fundamental para la unión a Caveolina-1**.

Para elucidar de manera directa la posible nitración en una o en las dos tirosinas, llevamos a cabo un abordaje proteómico, incubando el péptido MMP-13-CSD-BD con peroxinitrito a distintas concentraciones (100 nM-100 μ M). Tras una digestión triptica del mismo se analizó por espectrometría de masas los péptidos resultantes. Se rastrearon los iones correspondientes a los péptidos tripticos que contenían una de las 2 tirosinas, tanto las formas desnudas como las modificadas por la adición del grupo NO_2^- . Como resultado se identificó inequívocamente el residuo Y338 como el único sitio de nitración en el péptido MMP-13-CSD-BD (Fig 7B). En el análisis no se detectó el ión correspondiente al péptido nitrado en la tirosina Y360 (X en Fig 7B). Los péptidos control desnudos que contenían sendas tirosinas fueron analizados y detectados en sus correspondientes tiempos de retención. Estos resultados identifican la **tirosina Y338 de MMP-13** como una **diana del NO**, incluso empleando dosis de peroxinitrito muy bajas.

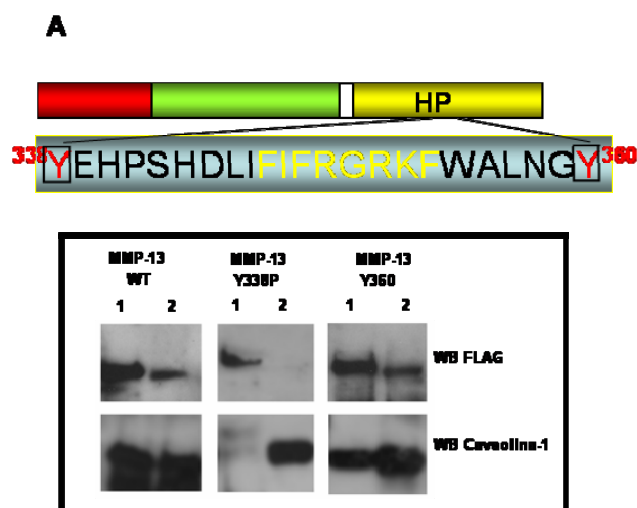


Fig.7. La tirosina 338 de MMP-13 es necesaria para la unión a Caveolina-1 y es una diana del NO en la nitración de tirosinas
 A) Panel superior: esquema de MMP-13 que representa los sitios que flanquean el CSD-BD que contienen las tirosinas mutadas (Y338 y Y360). Panel inferior: Experimento de Cross-coimmunoprecipitación de lisados de células BAEC que expresan MMP-13-FLAG o las distintas versiones de los mutantes de MMP13 en los que la tirosina en las posiciones 338 o 360 han sido sustituidos por fenilalanina (MMP-13-Y338F y MMP-13-Y360F). 1. inmunoprecipitación con anti-FLAG; 2. inmunoprecipitación con anti Caveolina-1 (n=3).

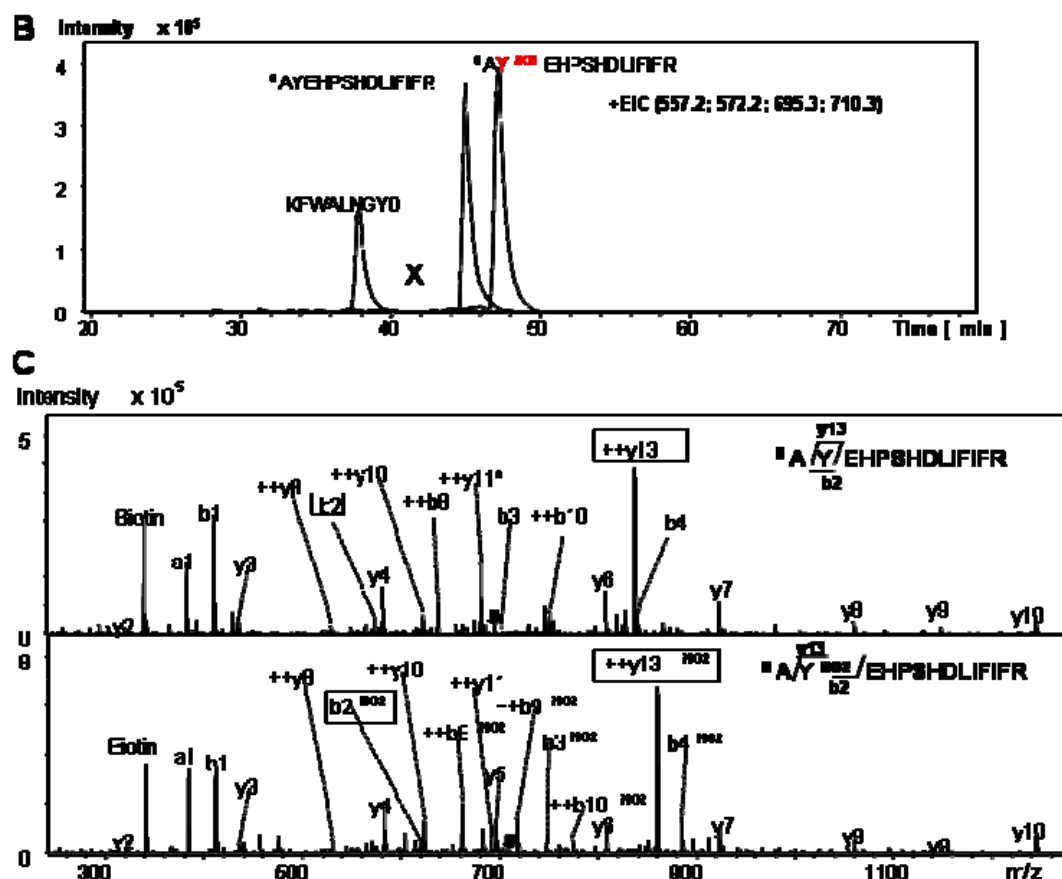


Fig.7. La tirosina 338 de MMP-13 es necesaria para la unión a Caveolina-1 y es una diana del NO en la nitración de tirosinas. B) Cromatograma (EIC) de los péptidos CSD-BD digeridos con tripsina. El péptido CSD-BD N-terminal biotinilado (^B) se trató con (100 nM-100 μM) de ONOO⁻, se digirió con tripsina, y fue analizado mediante espectrometría de trampa iónica acoplada a un sistema de cromatografía líquida como se describe en Materiales y métodos. El cuadro representa el EIC para los iones con m/z 557.2 Da (péptido doblemente cargado KFWALNGYD) y 695.3 Da (péptido triplemente cargado ^BAYEHPSHDLIIFR) y sus correspondientes péptidos (m/z 572.2 y 710.3 Da). Estos péptidos corresponden a la región C-terminal y N-terminal del CSD-BD, respectivamente. Ambos péptidos no modificados se detectaron pero solo un ión nitrado fue detectado con un valor de m/z 710.3 Da que contiene la primera tirosina nitrada.; no se detectó señal del péptido que contiene la segunda tirosina nitrada. C) Secuenciación y caracterización de los péptidos CSD-BD digeridos. El espectro MS/MS de los iones con m/z 695.3 (panel superior) y 710.3 Da (panel inferior) corresponden al péptido ^BAYEHPSHDLIIFR desnudo y nitrado en tirosina, respectivamente. La figura muestra los iones fragmento correspondientes a las series principales de fragmentación (b-amino, e y-carboxi). Están marcados la pérdida de agua (*) y los fragmentos doblemente cargados (++). Los iones recuadrados muestran que la nitración se ha caracterizado inequívocamente tanto por la serie y como por la serie b.

4.1.5. Estudio del NO en los procesos de reparación de herida en modelos de ratón.

La pérdida de Caveolina-1 aumenta el estrés nitrosativo dependiente de herida y acelera el cierre de las heridas en ratones.

Una vez demostrado el efecto del NO sobre la activación de MMP-13 tanto in vitro como en un ensayo funcional celular, decidimos avanzar en nuestra investigación mediante una aproximación in vivo, en modelos animales de reparación de heridas.

Para la realización del estudio usamos animales C57BL/6, sobre los cuales practicamos una excisión de tipo longitudinal de 0.5 cm en la espalda y monitorizamos en función del

tiempo el área que iba siendo ocupada por la piel. Analizando las biopsias tisulares histológicamente pudimos detectar como 6 días eran tiempo suficiente para cubrir más del 70% de la piel (Fig 8A), mientras que el análisis inmuno-histoquímico de las mismas con anticuerpos anti-MMP-13 y anti-nitrotirosina revelaron una elevada expresión de MMP-13 en su estado nitrado a día 4 (Fig 8B), detectando el mismo patrón al día sexto aunque de forma menos pronunciada. Al octavo día la nitración de la proteína ya no es detectable y la expresión de MMP-13 se observa muy disminuída.

Se ha descrito que Caveolina-1 es una molécula que interviene de forma importante en los procesos de migración y proliferación celular. Cada vez son más numerosas las contribuciones científicas en las que se pone de manifiesto la especial relevancia en procesos de tipo cancerígeno, en los que la falta de Caveolina-1 es un determinante positivo para la migración (Zhang, Razani et al. 2000; Hassan, Williams et al. 2006), especialmente en metástasis (Williams, Medina et al. 2004). Teniendo en cuenta este factor y debido a la estrecha relación que nosotros hemos observado entre la migración celular mediada por MMP-13 y su desanclaje de Caveolina-1, decidimos profundizar en este sentido e intentar analizar la relevancia de MMP-13 en ratones deficientes para Caveolina-1 en ensayos de reparación de heridas. Como primera aproximación medimos la velocidad del cierre de las heridas en ratones salvajes y deficientes en Caveolina-1, detectando que a día 6 solo el 15% del área herida permanecía abierta en los ratones deficientes frente al 30 % de los ratones WT (Fig 8C) resultados que fueron corroborados en ratones en los que produjimos dobles heridas encontrando el mismo patrón a día 12 después de la realización de la incisión (Fig 8D). Este conjunto de resultados pone de manifiesto **a Caveolina-1 como una molécula inhibidora en el proceso de reparación.**

Tras el posterior análisis inmunohistoquímico de las biopsias de los ratones, pudimos observar que la cantidad de MMP-13 en las heridas de los ratones no estaba alterada en función del genotipo, y 4 días después de la realización de las heridas no existían diferencias en la cantidad de proteína nitrada entre las biopsias de unos ratones y otros, y sin embargo, los ratones carentes de caveolina-1 (Fig 8E panel superior) presentaban una señal aumentada 6 días después de que se produjera la herida y un nivel considerable de colocalización con MMP-13. Para analizar el nivel de activación de MMP-13 en las pieles de los ratones se midió la actividad de la proteasa en el fluido recogido de la parte dorsal de las pieles heridas. Los ratones deficientes presentan un elevado el nivel de activación enzimática de MMP-13 frente a los salvajes. El fenotipo salvaje se pudo además recuperar en los ratones deficientes mediante la aplicación en las heridas del péptido inhibidor de la nitración de tirosinas, anteriormente utilizado en los ensayos de migración de células endoteliales (RYEYA), detectando niveles de actividad enzimática y cierre de las heridas semejante al detectado en los ratones que expresan Caveolina-1 (Fig 8G, 8H, 8I). Todos estos resultados se correlacionan de forma directa con el

efecto que MMP-13 tiene sobre la migración celular a través de su desacoplamiento de Caveolina-1 gracias a la nitración de la tirosina 338 de su estructura primaria.

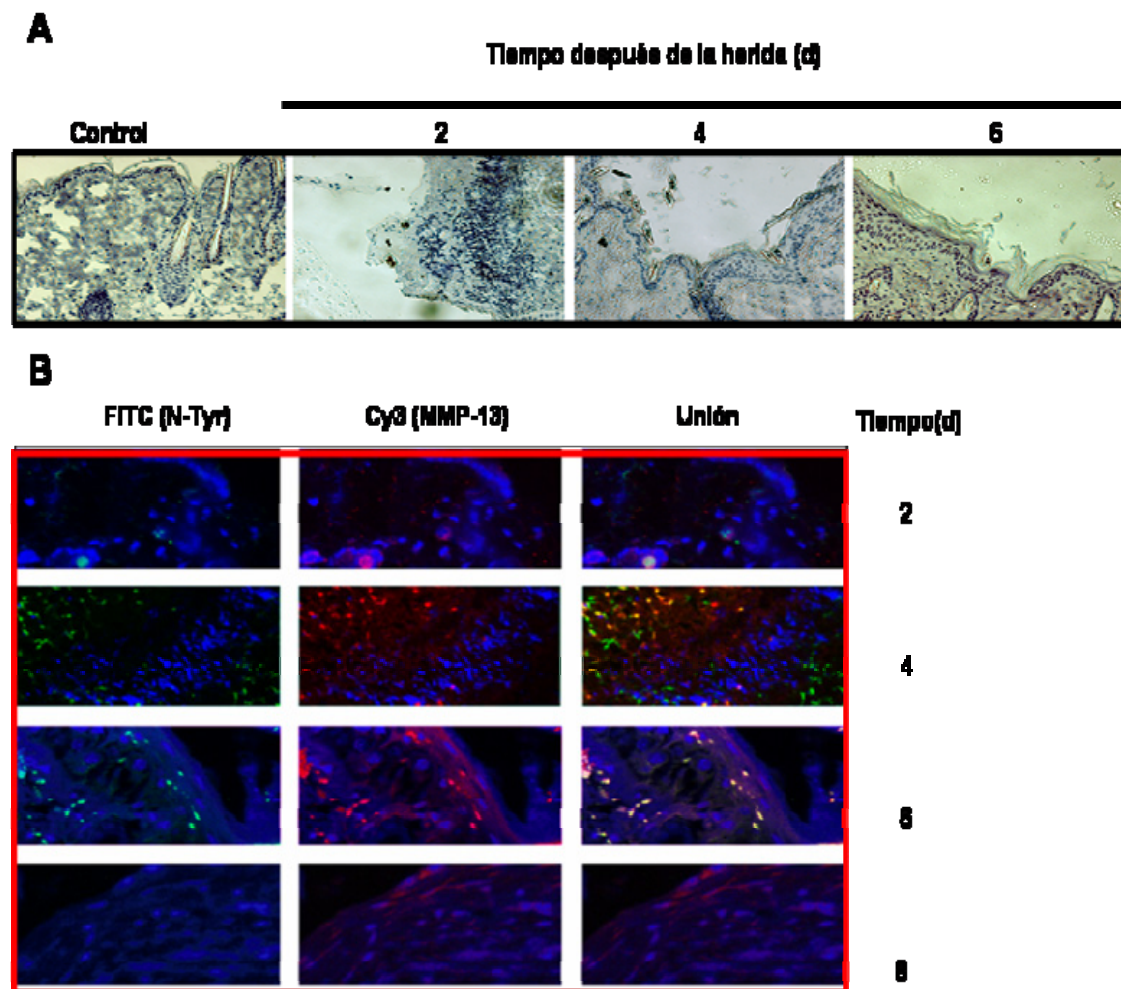


Fig 8. La pérdida de Caveolina-1 aumenta el stress nitrosativo dependiente de herida y acelera el cierre de las heridas en ratones. A) Se realizaron incisiones (0.5 cm) en la espalda de ratones C57BL/6. Se recogen biopsias de las pieles cada dos días y se embeben en parafina tiñéndose después con eosina-hematoxilina (n=10 ratones/periodo de tiempo) B) Microscopía confocal de las biopsias de las pieles de los ratones preparadas como en A. Se detectó MMP-13 (rojo) y N-tyr (verde) (n=10 ratones/periodo de tiempo). Se usaron como anticuerpos secundarios FITC y Cy3. Los paneles Unión indican los sitios de colocación (amarillo) encontrando a día 4 un patrón elevado de colocación.

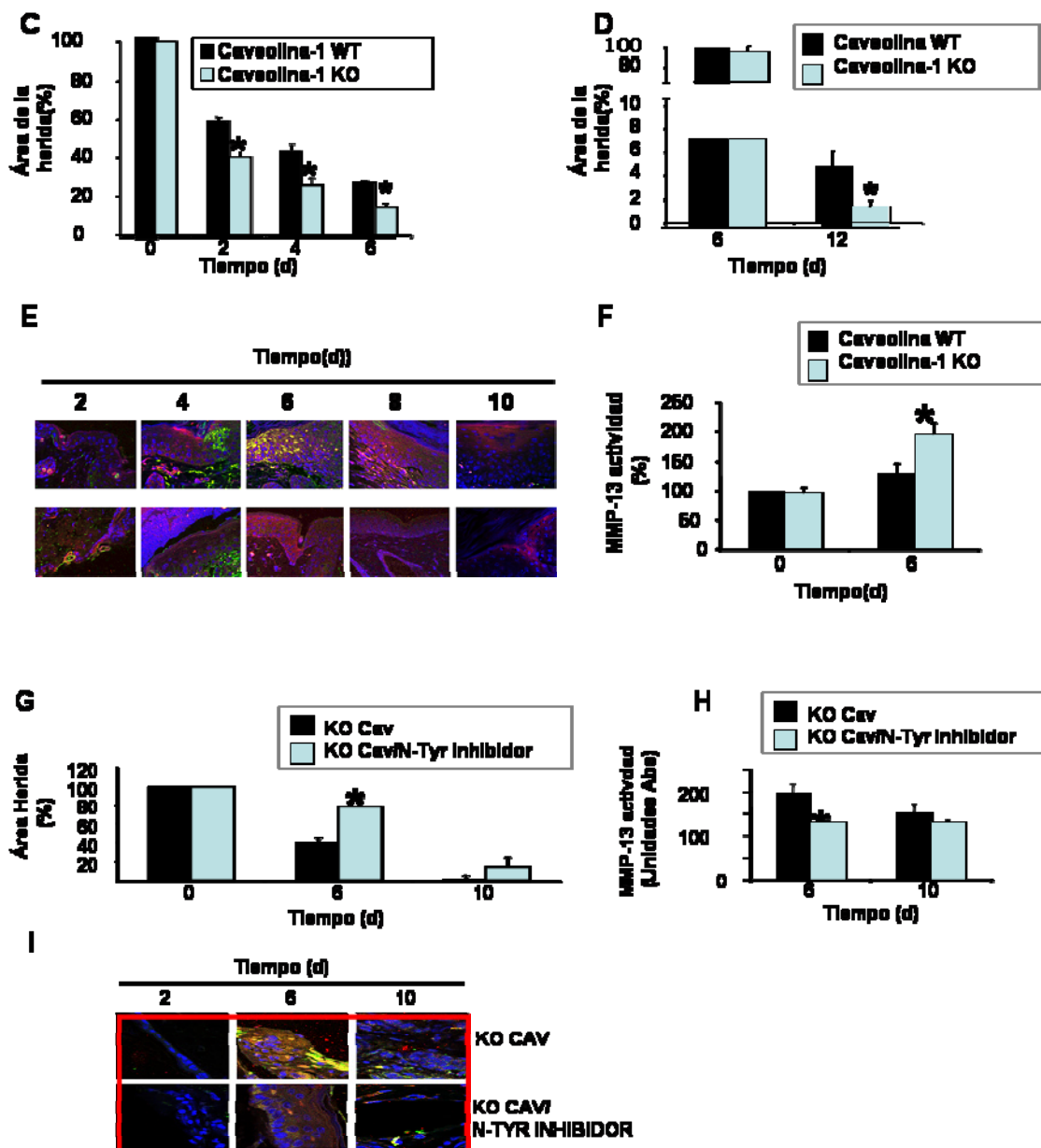


Fig 8. La pérdida de Caveolina-1 aumenta el stress nitrosativo dependiente de herida y acelera el cierre de las heridas en ratones. C) Se realizaron incisiones (0.5 cm) en la espalda de ratones C57BL/6 y ratones KO caveolina-1 y se monitorizó en el tiempo el área que no había sido ocupada por la piel. Los resultados se expresan como el porcentaje del área herida inicial (n=10 ratones/tiempo de medida, significación +- SD; *p<0.05 vs tiempo empleado por los WT). D) Igual que para el punto C pero con 2 incisiones realizadas en la espalda de los ratones de 1 cm E) Inmunofluorescencia confocal de las biopsias de las pieles de los ratones preparadas como en C) (Ratones KO cav-1 en el panel superior; Ratones WT en el panel inferior). MMP-13 (Rojo) y N-Tyr (verde) pudiendo detectarse en amarillo los puntos de colocalización (n=10 ratones/tiempo medido). F) Medida de la actividad MMP-13 (ver métodos experimentales) en el fluido recogido de la parte dorsal de las pieles heridas de ratones KO Cav-1 y WT, realizado como en C. El resultado está representado como el porcentaje de la actividad que se encuentra en los ratones WT en el tiempo de la herida (n=10 ratones/tiempo medido; +- SD; *p<0.05 vs tiempo empleado por los WT) G) Realización de heridas (0.5 cm) en la espalda de los ratones KO cav-1 y tratamiento de la herida con el péptido inhibidor de la nitración de tirosinas RYEYA (100µM) cada día durante 10 días (n=10 ratones/tiempo de medida). El tamaño de la herida se representa como el porcentaje del área herida inicial (significación +- SD; *p<0.05 Caveolina-1 KO/ inhibidor N-Tyr vs caveolina-1 KO). H) Medida de la actividad MMP-13 en el fluido recogido de la parte dorsal de las pieles heridas de ratones KO cav-1 y KO cav-1 tratados con el inhibidor de N-Tyr como en G. Los resultados se representan como unidades de absorbancia (significación +- SD; *p<0.05). I) Microscopia confocal de MMP-13 (rojo) y N-Tyr (verde) en biopsias de pieles heridas tratadas como en G. Los puntos amarillos muestran colocalización.

La reparación de las heridas mediada por el NO en los ratones es dependiente de la activación de MMP-13

Los resultados anteriormente expuestos ilustran sobre la relevancia de MMP-13 en la migración celular, así como el efecto de la nitración sobre la actividad de dicha metaloproteasa. No obstante, y con el objeto de intentar demostrar que la nitración de MMP-13 y no de otras proteínas es el factor decisivo en el cierre mediado en definitiva por el NO, realizamos los mismos ensayos que habíamos practicado previamente en ratones deficientes para iNOS (iNOS). Encontramos que en los ratones que no expresan iNOS la actividad de MMP-13 está considerablemente disminuída tanto en presencia como en ausencia del inhibidor de nitración de tirosinas durante los procesos de reparación de heridas (Fig 9A). Además, monitorizando en el tiempo la velocidad de cierre de las heridas pudimos comprobar como estos ratones presentan un sustancial retardo, el cual no es sensible a la nitración, tal y como era de esperar, al carecer de NO ante la respuesta de tipo inflamatorio que tiene lugar como consecuencia del daño practicado (Fig 9B). Para dilucidar el efecto de MMP-13 en este proceso, empleamos animales deficientes para el gen de MMP-13, y encontramos un patrón de retardo muy similar al de los deficientes para iNOS en la reparación de las heridas, independiente de la inhibición de la nitración (Fig 9B).

Finalmente realizamos biopsias de las pieles de los animales salvajes, carentes de MMP13 y carentes de iNOS, viendo como los animales salvajes muestran colocalización entre MMP-13 (rojo) y N-Tyr (verde) a día 15 de cierre de las heridas (Fig 9C), siendo esta dependiente del inhibidor de nitración de las proteínas, mientras que los animales sin iNOS presentan una disminución en los niveles de MMP-13 independiente del inhibidor de N-Tyr, y los animales carentes de MMP-13 muestran el mismo patrón de expresión de nitración de proteínas (verde) en presencia o en ausencia del Inhibidor de N-Tyr.

Con estos datos podemos concluir, que la activación de MMP-13 en los procesos de reparación de herida a través del NO nitrando el residuo de tirosina Y338, es fundamental para permitir el cierre de las heridas, tanto en experimentos celulares, como lo que es más relevante en experimentos en ratones in vivo.

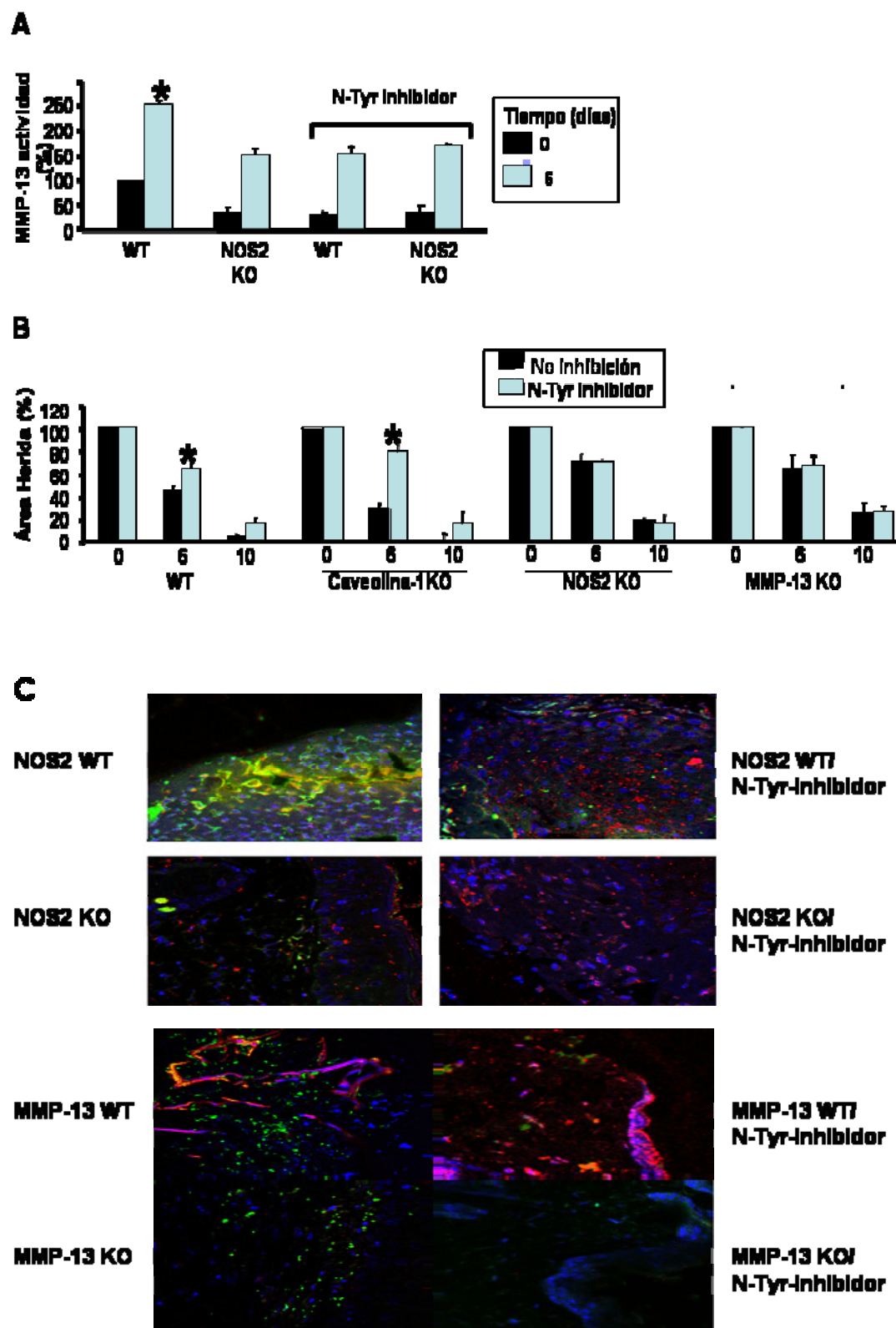


Fig 9. La reparación de las heridas mediada por el NO en los ratones es dependiente de la activación de MMP-13. A) Medida de la actividad MMP-13 en ratones WT y KO iNOS, con y sin tratar con el péptido RYEYA. B) Se realizaron incisiones (0.5 cm) en la espalda de ratones C57BL/6 ratones KO caveolina-1, ratones KO MMP-13 y ratones KO iNOS y se trataron con y sin RYEYA. Se monitorizó en el tiempo el área que no había sido ocupada por la piel. Los resultados se expresan como el porcentaje del área herida inicial (n=10 ratones/tiempo de medida, significación \pm SD; * $p < 0.05$ vs tiempo empleado por los WT). C) Inmunofluorescencia confocal de las biopsias de las pieles de los ratones WT, ratones KO MMP-13 y ratones KO iNOS. Se pudo detectar MMP-13 (rojo) y N-Tyr (verde) tras 10 días de la incisión (n=10 ratones/tiempo medido) observándose puntos de colocalización (amarillo).

4.2. BLOQUE II

La ausencia de NO protege frente al desarrollo de aneurismas de aorta a través de la modulación de la expresión de MMPs

El bloque de resultados expuesto anteriormente, revela la importancia del NO en procesos relacionados con la motilidad endotelial y las vías ejercidas por este factor vaso activo empleadas para ello. La implicación real que el NO ejerce en un proceso patológico concreto del sistema cardiovascular ha sido el objetivo de nuestro estudio, y constituye el segundo gran objetivo de esta tesis.

Con el objeto de elucidar si el NO ejerce un papel a través de la activación/inhibición de la actividad proteolítica de determinados MMPs, en un contexto patológico real, hemos generado en el laboratorio un modelo quirúrgico en ratones de aneurisma de aorta abdominal (AAA) y hemos analizado este efecto en un estudio humano con muestras de pacientes afectados de AAA.

4.2.1. Estudio del NO en el desarrollo de AAA a través de la activación de metaloproteasas.

La falta del gen de la Sintasa de óxido Nítrico inducible (iNOS), inhibe la progresión de los aneurismas

Para analizar la relevancia de iNOS en el desarrollo y progresión de los AAA, inducimos quirúrgicamente la patología de los aneurismas abdominales de aorta en ratones salvajes y carentes de iNOS monitorizando la progresión de la enfermedad mediante resonancia magnética nuclear (RMN). Encontramos amplias dilataciones de las aortas 14 días después de que los ratones fuesen perfundidos con elastasa en los ratones salvajes frente a los deficientes para iNOS (Fig 10A), lo que se asoció a una destrucción de las láminas aórticas como detectamos por una tinción de Masson de los anillos aórticos de estos ratones (Fig 10B).

También evaluamos el efecto del NO en AAA usando animales deficientes en el gen apoE ya que se ha descrito una fuerte asociación entre la ocurrencia de AAA y aterosclerosis. Para ello generamos ratones doblemente deficientes iNOS/ apoE, y 4 semanas después de su nacimiento se alimentaron con una dieta grasa, rica en colesterol, que induce el desarrollo de placas ateroscleróticas en estos animales. Después de la perfusión de elastasa no encontramos correlación entre la aterosclerosis y el desarrollo de los AAA cuando comparamos los ratones salvajes y deficientes para apoE; Sin embargo, los ratones doblemente deficientes iNOS/ apoE resultaron estar protegidos frente al desarrollo de la enfermedad (Fig 10A, 10B). Para corroborar este resultado se tomaron de forma adicional imágenes de las aortas abdominales de cada individuo en las que se puede llevar a cabo una reconstrucción tridimensional en la región

abdominal. Gracias a la obtención de angiografías de cada uno de los animales empleados fuimos capaces de confirmar el papel protector de la ausencia de NO en la progresión de las AAA (Fig 10C).

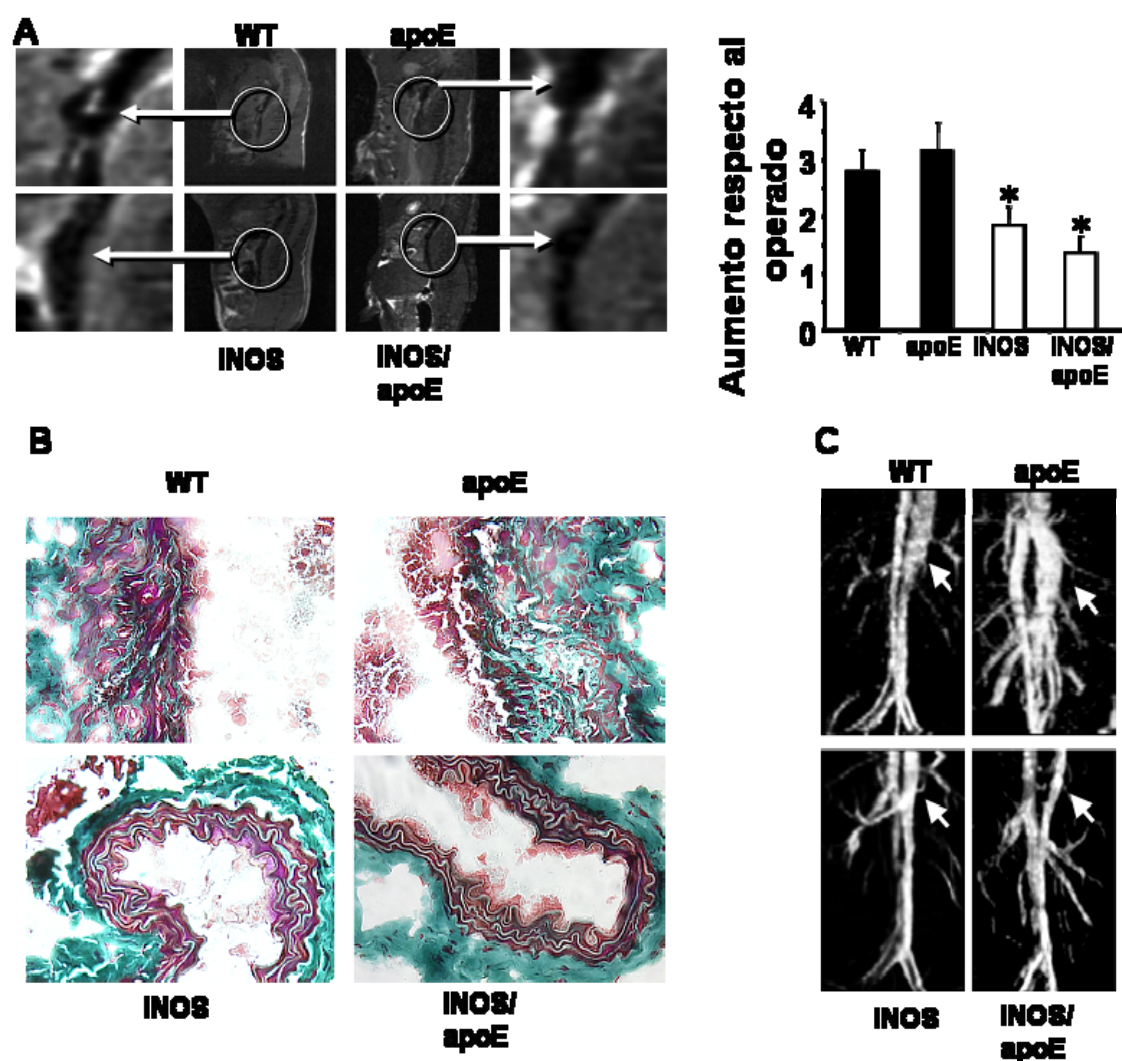


Fig 10. La falta del gen de la Sintasa de óxido Nítrico inducible (iNOS), inhibe la progresión de las aneurismas. A) RMN de ratones operados con un aneurisma abdominal de aorta, monitorizando a lo largo del tiempo la progresión de la aneurisma en los diferentes modelos animales. Se observa un claro engrosamiento de la aorta en los animales WT vs los KO iNOS Y KO NOS 2 /APOE. Los animales KO APOE parecen tener un engrosamiento mayor de la aorta. B) Tinción de los anillos aórticos de los ratones operados de AAA, con Tricrómico de Masson. C) Mediante RMN, se generan angiografías de los modelos animales de estudio para ver la progresión del desarrollo del engrosamiento de las aortas. Estas angiografías fueron realizadas de manera individual a cada ratón.

La falta de iNOS inhibe la expresión de MT1-MMP y MMP-13 en AAA de ratón

Uno de los hecho más característicos de los AAA, es el disparo de distintas actividades proteolíticas, incluidas las MMPs. En nuestro modelo quirúrgico evaluamos mediante técnicas de inmunofluorescencia y Western Blot, la expresión de MMP-2, MMP-9, MMP-12, MMP-13 y MT1-MMP en los distintos ratones que han sido perfundidos a lo largo del tiempo. No encontramos diferencias en la expresión pasados 10 días desde que se realizó la inducción del aneurisma entre ratones salvajes y ratones deficientes para iNOS. Sin embargo, a día 15 se

detecta una disminución en la expresión de MMP-13 y MT1-MMP en los ratones carentes de iNOS, con respecto a los ratones salvajes y un leve descenso aunque no significativo de expresión para MMP-9. Estos resultados parecen indicar que la protección frente a la progresión de AAA en ratones que carecen de NO podría ser debida a una inhibición de MMPs en estos ratones.

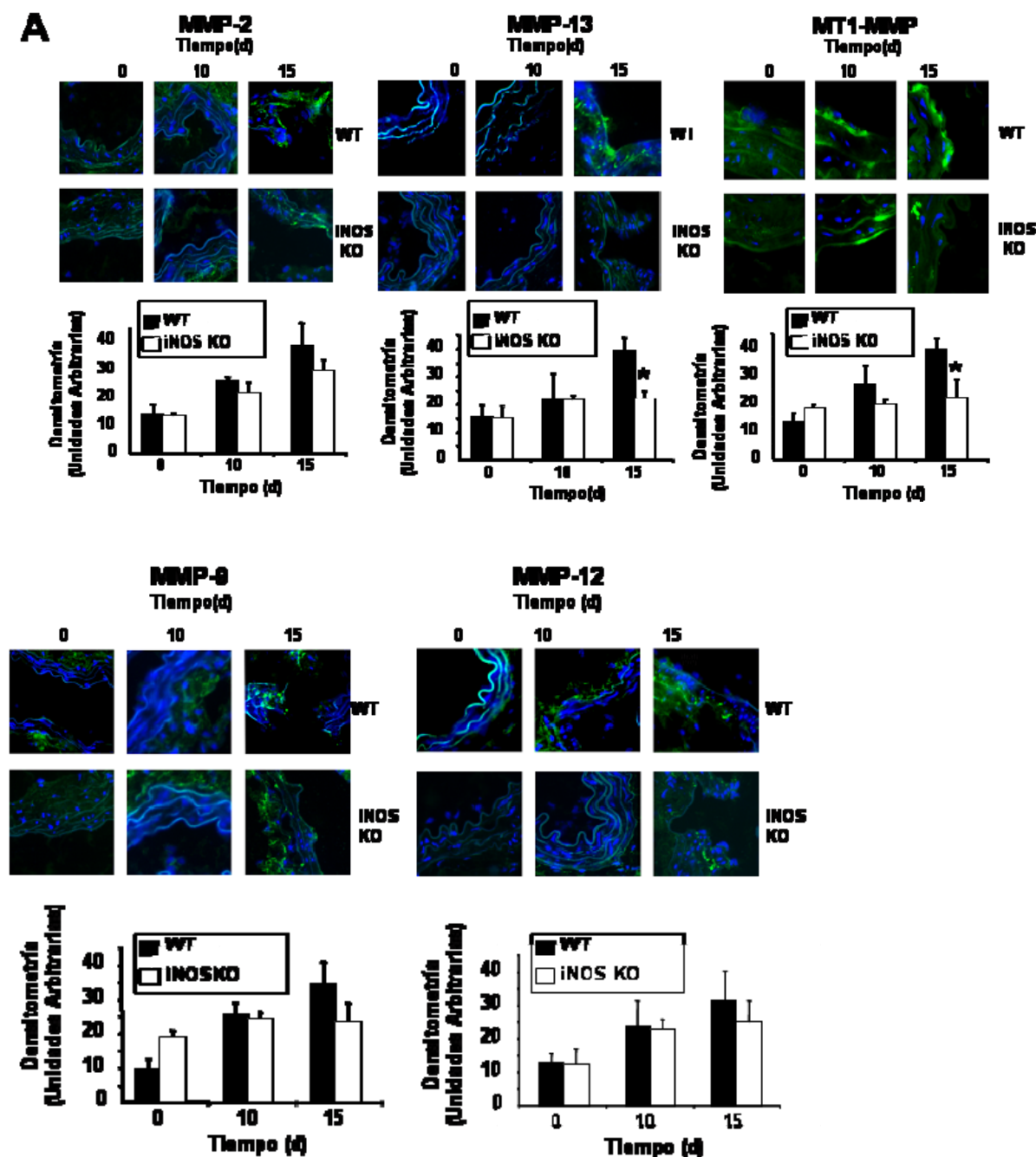


Fig11. La falta de iNOS inhibe la expresión de MT1-MMP y MMP-13 en AAA de ratón. A) Medidas de Inmunofluorescencia de aortas de ratones WT y KO iNOS operados con elastasa. En verde se observan las tinciones para los distintos anticuerpos primarios (MMP-2, MMP-13, MT1MMP, MMP-9, MMP-12). Para cada una de las tinciones aórticas se han realizado las densitometrías correspondientes.

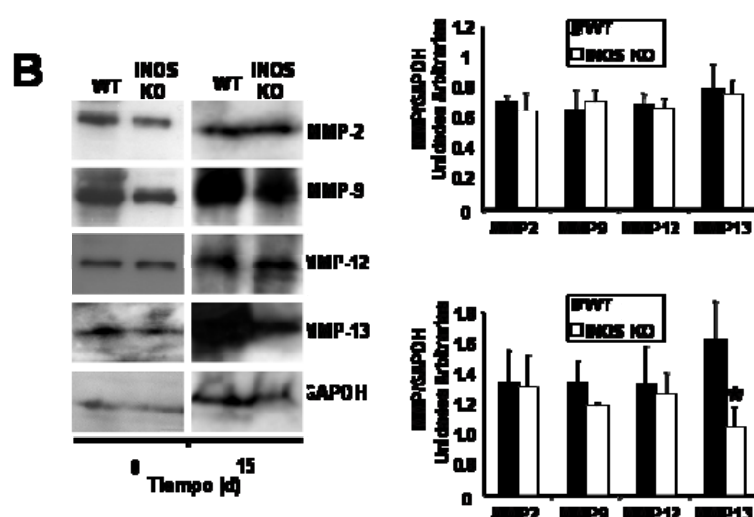


Fig.11. La falta de iNOS inhibe la expresión de MT1-MMP y MMP-13 en AAA de ratón. B) Western Blot de proteínas aisladas de las aortas de los ratones operados WT y KO iNOS con elastasa, midiendo los niveles de expresión de las distintas metaloproteasas (MMP-2, MMP-13, MT1MMP, MMP-9, MMP-12).

MMP-13, MT1-MMP e iNOS están sobreexpresadas en las muestras humanas de aorta de pacientes que han sido operados de aneurismas de aorta abdominal.

Una vez puesto de manifiesto en ratones la contribución de NO en la progresión de los AAA, decidimos dotar de relevancia nuestro hallazgo estudiando muestras de pacientes sometidos a intervención quirúrgica por padecer AAA (Tabla 2). El análisis inmunohistoquímico de las muestras revela la existencia de una estrecha relación en las mismas entre los niveles de iNOS y la expresión de MMP-13 y MT1-MMP. Además en los pacientes que presentaban aneurismas la tinción con anticuerpo anti nitrotirosina, reveló la existencia de elevados índices de nitración que se correlacionan con las zonas dónde los niveles de expresión de MMP-13 son más elevados (Fig 12 A,B)

Tabla 2. Características de los pacientes

| | |
|--------------------|---------------|
| Edad | 71.33 (59-82) |
| Hembras-Machos (%) | 100 |
| Estatinas (%) | 50 |
| Hipertensión (%) | 66.67 |
| Fumadores (%) | 94.44 |
| Diabetes (%) | 27,78 |

Fig.12. MMP-13, MT1-MMP e iNOS están sobreexpresadas en las muestras humanas de aorta de pacientes que han sido operados de aneurismas de aorta abdominal. Tabla 2. Datos adicionales de los pacientes en los que se ha hecho el estudio

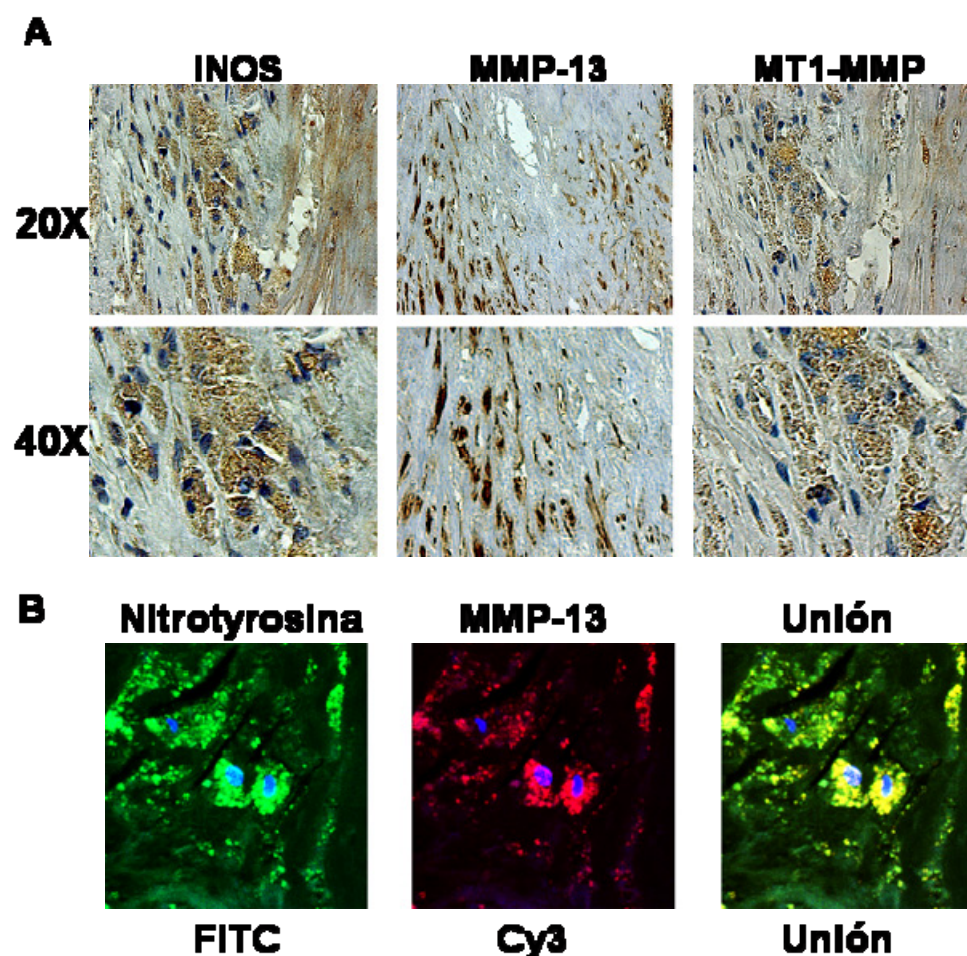


Fig.12. MMP-13, MT1-MMP e iNOS están sobreexpresadas en las muestras humanas de aorta de pacientes que han sido operados de aneurismas de aorta abdominal. A) Aortas humanas de pacientes que han sido operados de aneurismas de aorta abdominal. Inmunohistoquímica de las aortas con anticuerpos anti MMP-13, iNOS, MT1-MMP. B) Experimentos de inmunohistoquímica de aortas de pacientes que han sido operados de aneurisma de aorta abdominal. Expresión con anticuerpos anti nitrotirosina (verde) y anti MMP-13 (rojo) El Panel Unión determina la colocalización entre estos dos anticuerpos (amarillo)

Expresión inhibida de EMMPRIN en ratones KO iNOS durante el desarrollo de aneurismas de aorta abdominal.

Tal y como hemos comentado en la introducción, de forma reciente se ha puesto de manifiesto la relación entre la ocurrencia de determinadas patologías del sistema cardiovascular con la expresión de moléculas denominadas EMMPRIN (inductor de MMPs). Con el objetivo de detectar su implicación en AAA y además intentar determinar si el NO puede estar ejerciendo algún papel sobre esta molécula, tomamos biopsias de las aortas animales salvajes y deficientes para iNOS, transcurridos 10 y 15 días después de ser sometidos al procedimiento quirúrgico. Mediante un abordaje inmunohistoquímico, pudimos detectar la ausencia de señal para EMMPRIN en aquellos ratones que no expresan iNOS (Fig 13A)

Asimismo, realizamos ensayos de inmunoblot a los mismos tiempos de inducción encontrando la existencia de 3 bandas de fragmentos inmunoreactivos de EMMPRIN en los

ratones salvajes en condiciones normales: una banda de 25 kDa, otra de 37 y otra de 50, las cuales se sobreexpresan en animales salvajes sometidos a una perfusión con elastasa porcina. Sin embargo, en los ratones deficientes de iNOS detectamos muy débilmente los dos fragmentos de más alto peso molecular, que corresponden a las formas glicosiladas de EMMPRIN, cuya presencia se incrementó levemente como consecuencia del AAA. (Fig 13B). Teniendo en cuenta que EMMPRIN es un activador de MMPs, podemos postular que en los ratones carentes de iNOS, **la falta de EMMPRIN** podría representar una manera de **protección** frente a la progresión de las AAA.

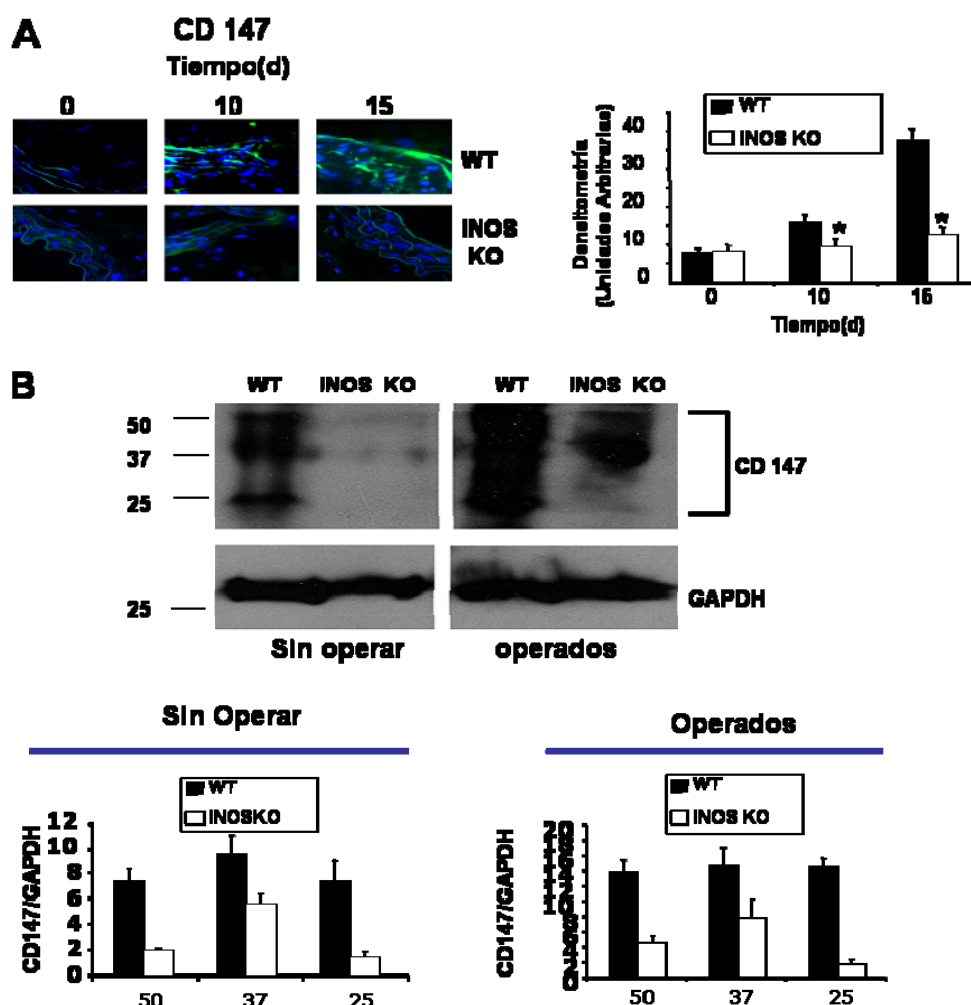
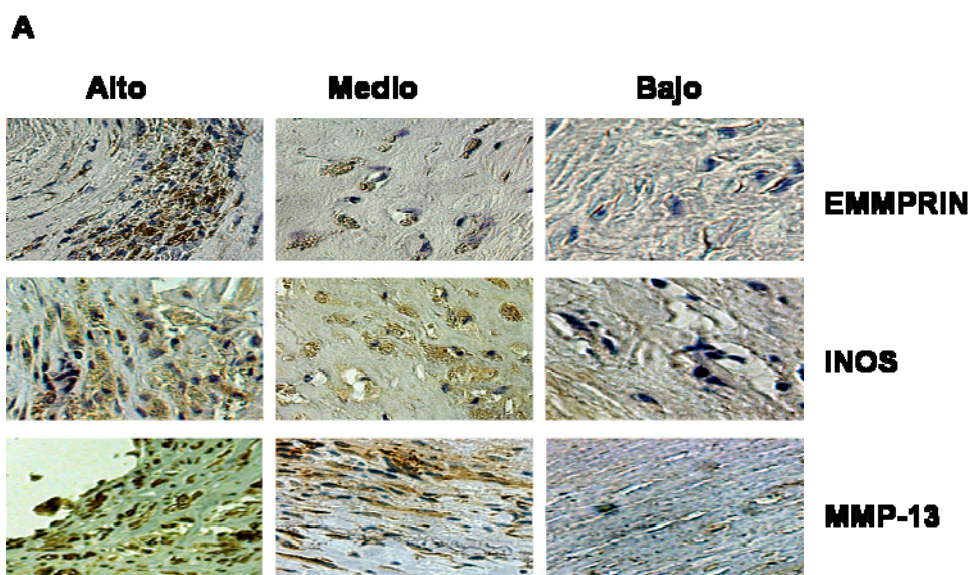


Fig. 13. Expresión inhibida de EMMPRIN en ratones KO iNOS durante el desarrollo de aneurismas de aorta abdominal. A) Inmunohistoquímica de aortas de ratones WT y KO iNOS operados con elastasa porcina. El anticuerpo EMMPRIN se visualiza en color verde. B) Western Blot de proteínas de aortas (cada punto es un pull de 3 ratones) operados o no con elastasa porcina. Se observan los tres fragmentos inmunoreactivos correspondientes a las tres bandas de la molécula de EMMPRIN (50, 37 y 25 KDa). Control de carga GAPDH (25 KDa).

Correlación entre MMP-13, EMMPRIN, e iNOS en muestras de aortas de pacientes operados de aneurisma de aorta abdominal.

Para dilucidar la relación existente entre MMP-13, EMMPRIN e iNOS, tomamos biopsias de aortas de pacientes que habían sido operados de aneurisma de aorta abdominal, frente a muestras correspondientes de pacientes sanos, que fueron donadas postmortem. En este tipo de estudios encontramos una variabilidad de muestras muy extensa, aunque con los datos obtenidos podemos concluir que aquellos pacientes cuyas aortas expresan niveles elevados de EMMPRIN también los presentan de iNOS y de MMP-13. Los coeficientes de correlación del test de Pearson, revelan una correlación positiva entre la expresión de iNOS, EMMPRIN, y MMP-13 (Fig 14B), lo que nos permite postular que el efecto del NO sobre el desarrollo de AAA, puede estar mediado a través de la expresión y activación de EMMPRIN, el cual a su vez, estaría induciendo la expresión de las distintas MMPs, incluida MMP-13.



B

| | iNOS | EMMPRIN | MMP-13 |
|---------|-------------------------|-------------------------|--------|
| iNOS | 1 | | |
| EMMPRIN | 0.8477040 (P=0.8818) | 1 | |
| MMP-13 | 0.7010740 (P=0.7061) | 0.8418657 (P=0.9999) | 1 |

Fig. 14. Correlación entre MMP-13, EMMPRIN, e iNOS en muestras de aortas de pacientes operados de aneurisma de aorta abdominal. A) Inmunohistoquímicas de aortas de pacientes operados con aneurismas de aorta abdominal. Tinción con anticuerpo anti-EMMPRIN (Panel Superior) anti iNOS (Panel central), anti MMP-13 (Panel inferior). B) Test de Pearson

4.2.2 Estudio del papel de EMMPRIN en la regulación de la actividad de MMP-13.

La sobreexpresión de EMMPRIN induce la acumulación en el espacio extracelular de MMP-13.

Para tratar de esclarecer la función de EMMPRIN en la regulación de las MMPs en el endotelio vascular, procedimos a la sobreexpresión de EMMPRIN en células MAEC (Fig 15A). Para ello clonamos el cDNA codificante de EMMPRIN en el vector P3X-FLAG gracias al cual pudimos fusionar el epítipo de FLAG en su extremo amino-terminal y así poder discriminar entre la proteína ectópicamente expresada de la forma endógena. Tras sobreexpresar EMMPRIN en las células endoteliales pudimos evaluar los niveles de expresión de MMP-13 y de MT1-MMP por microscopía confocal (Fig 15B), observando que la sobreexpresión de EMMPRIN en estas células no modifica los niveles de expresión de MT1-MMP, pero sí produce una disminución de la detección de MMP-13. Ante este resultado el cual podía indicar que EMMPRIN disminuye la expresión de MMP-13, decidimos evaluar por inmunoblot la expresión de MMP-13 en los sobrenadantes de células transfectadas con EMMPRIN. Este estudio reveló que FLAG-EMMPRIN no regula negativamente la expresión de MMP-13, pero sí que induce la secreción de MMP-13 al espacio extracelular (Fig 15C) como también la activación de la proteasa (Fig 15D). **Según los datos expuestos podemos concluir que la expresión de EMMPRIN, activa MMP-13 en las células endoteliales y hace que aumente la cantidad de MMP-13 activa en el espacio extracelular.**

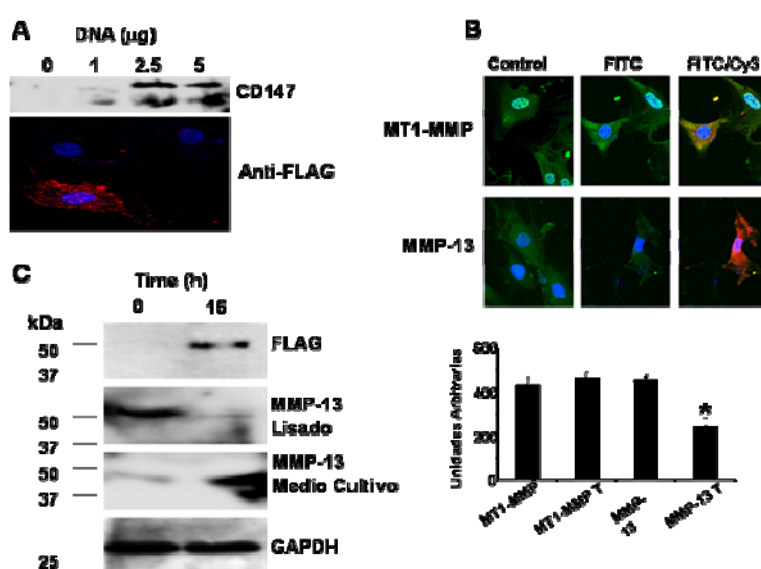


Fig. 15. La sobreexpresión de EMMPRIN induce la acumulación en el espacio extracelular de MMP-13. A) Sobreexpresión de EMMPRIN, en células MAEC WT. Experimento realizado con distintas dosis de transfección de DNA (Panel Superior). Panel Inferior: Microscopía confocal de muestra células MAEC que sobreexpresan la molécula EMMPRIN (en rojo anticuerpo anti FLAG). B) Microscopía confocal de células MAEC transfectadas con EMMPRIN-FLAG (rojo) y análisis de los niveles de expresión de MT1-MMP y MMP-13 (verde)

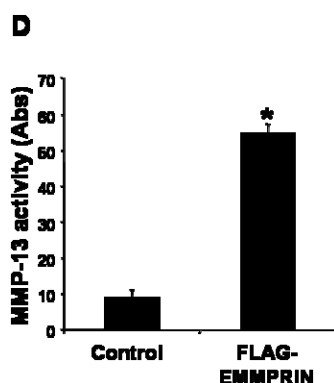


Fig. 15. La sobreexpresión de EMMPRIN induce la acumulación en el espacio extracelular de MMP-13. C) Panel superior: Lisados de células MAEC transfectadas con EMMPRIN. WB: FLAG. Panel medio superior: Lisados de células MAEC wt transfectadas con EMMPRIN. WB: MMP-13. Panel medio inferior: sobrenadantes de células MAEC transfectadas con EMMPRIN WB: anticuerpo MMP-13. Panel Inferior: control de carga de las células GAPDH. D) Medida de la actividad MMP13 en sobrenadantes de células MAEC transfectadas con EMMPRIN-FLAG.

El silenciamiento de EMMPRIN en células MAEC inhibe la expresión de MMP-13:

Para evaluar el posible efecto de EMMPRIN, sobre la expresión de MMP-13, procedimos su silenciamiento en células endoteliales de aorta de ratón mediante RNA de interferencia, y vimos que la expresión de **MMP-13** se encontraba **inhibida** en esas células, (Fig 16A). Sin embargo, en contra de lo que ocurría cuando sobreexpresábamos EMMPRIN, la actividad de MMP-13 en los sobrenadantes celulares no mostró diferencias significativas.

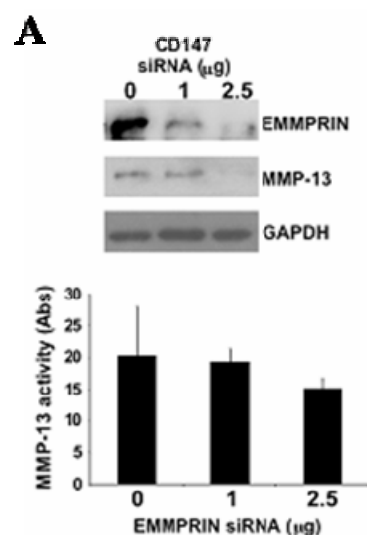


Fig 16. El silenciamiento de EMMPRIN en células MAEC inhibe la expresión de MMP-13. Panel Superior. Silenciamiento de EMMPRIN en células MAEC y medida de los niveles de expresión de MMP-13. Panel Inferior. Medida de actividad de MMP-13 en los sobrenadantes celulares de las células MAEC silenciadas.

Los resultados de la investigación concluyen que **el NO producido por la sintasa inducible de NO, iNOS, favorecen el desarrollo y progresión de los aneurismas de aorta abdominal, a través de la activación del inductor de metaloproteasas EMMPRIN, capaz de**

activar la metaloproteasa MMP-13, cuya expresión se encuentra reducida en AAA de ratones deficientes en iNOS. Existe un mecanismo de activación de dicha proteasa a través de EMMPRIN, ya que los experimentos de silenciamiento de dicha molécula en células MAEC producen la inactivación de MMP-13, y la sobreexpresión de EMMPRIN en dichas células activan la proteasa.

5. DISCUSIÓN

5. DISCUSIÓN

5.1. BLOQUE I

En nuestro estudio hemos identificado el mecanismo molecular por el cual el NO media los procesos de cierre de herida a través de la disociación del complejo Caveolina-1/MMP-13 produciendo un aumento de MMP-13 en el espacio extracelular. Nuestros resultados muestran la unión directa de MMP-13 a Caveolina-1 a través de la interacción con una región específica de MMP-13, localizada en el dominio de tipo hemopexina, con el dominio “scaffolding” de Caveolina-1. El NO es capaz de romper esta interacción a través de un mecanismo que implica la nitración de un residuo de tirosina, localizado en el dominio hemopexina de MMP-13, en la posición 338 de la estructura primaria de la proteasa.

La importancia de las MMPs durante los procesos de reparación tisular y migración celular está ampliamente estudiada (Page-McCaw, Ewald et al. 2007; Qiu, Kurpakus-Wheater et al. 2007). MMP-13 es la colagenasa de ratón por excelencia y se ha encontrado su expresión en distintas líneas celulares en cultivo que están implicadas en diversos procesos de migración: condrocitos adultos y fetales (Reboul, Pelletier et al. 1996; Johansson, Saarialho-Kere et al. 1997), células de músculo liso, monocitos, células endoteliales, linfocitos T (Willmroth, Peter et al. 1998), condrocitos osteoartóricos (Reboul, Pelletier et al. 1996), células epiteliales del ligamiento periodontal (Uitto, Airola et al. 1998) y fibroblastos sinoviales de pacientes con artritis reumatoide (Westhoff, Freudiger et al. 1999), así como en las líneas celulares derivadas de cáncer de cabeza, cuello y de vulva (Kahari, Johansson et al. 1998; Bostrom, Ravanti et al. 2000). Nosotros hemos descrito en estudios previos de nuestro grupo que **MMP-13 es importante en los procesos de cierre de heridas de células endoteliales, y su activación es dependiente de NO** (Lopez-Rivera, Lizarbe et al. 2005).

A pesar de que estudios anteriores se detectó la interacción entre Caveolina-1 con distintas MMPs (Labrecque, Nyalendo et al. 2004; Williams, Medina et al. 2004; Lopez-Rivera, Lizarbe et al. 2005) ésta es la primera identificación del dominio concreto de la proteasa que es responsable de la interacción con Caveolina-1. MMP-13 se une al dominio “scaffolding” de Caveolina-1 (CSD) a través de una secuencia que se ha llamado CSD dominio de unión o CSD-BD que se localiza en la región C-terminal de MMP-13 dentro del dominio de tipo hemopexina. Esta secuencia incluye 8 aminoácidos correspondientes al motivo: FIFRGRKF que hemos identificado basándonos en el motivo descrito como secuencia de interacción con Caveolina-1 (Couet, Li et al. 1997). Nosotros hemos observado cómo la tirosina Y338 es necesaria para la interacción entre MMP-13 y Caveolina-1. El CSD-BD de MMP-13 está formado por 25 aminoácidos (residuos 337-361) y se encuentra flanqueado por dos residuos de tirosinas. Cuando sustituimos la tirosina Y338 por fenilalanina conseguimos la inhibición de la

interacción entre MMP-13 y Caveolina-1, demostrando así que este residuo es necesario para la interacción con estas proteínas.

A pesar de ser el componente mayoritario y un elemento estructural requerido para la arquitectura caveolar, la Caveolina-1 también funciona como un elemento de anclaje a la membrana para distintas proteínas envueltas en procesos de señalización celular. En general la Caveolina-1 impide la función a las proteínas que se le unen y aquellas señales que tienden a promover la disociación de Caveolina-1, tienden a aumentar la funcionalidad de esas proteínas (Pike 2005; Stan 2005), y por lo tanto, es un concepto cada vez más generalizado el pensar en la **Caveolina-1 como un inhibidor de la actividad enzimática**. Tal es el caso de la interacción Caveolina-1/eNOS (Garcia-Cardena, Martasek et al. 1997; Razani, Woodman et al. 2002). El efecto inhibidor de la Caveolina también se ha podido comprobar para las metaloproteasas que previamente habían sido descritas como capaces de interaccionar con Caveolina-1. En concreto, se ha visto que la colocalización entre Caveolina-1/MMP-2 y Caveolina-1/MMP-9 también impiden la función de las mismas (Puyraimond, Fridman et al. 2001) aunque sin embargo para MT1-MMP se requiere de su unión a Caveolina-1 para que la proteasa sea activa (Galvez, Matias-Roman et al. 2004). Estas diferencias entre MMP-2, 9, 13 respecto a MT1-MMP podrían ser debidas a que MT1-MMP es una proteína de unión a membrana y no es secretada al exterior celular para llevar a cabo su función. En definitiva, el mecanismo de regulación de la actividad de las metaloproteasas a través de su unión a Caveolina-1 está finamente regulado y es específico para cada MMP, no obstante parece que un posible mecanismo general de acción sería que la unión de MMPs que se excretan al exterior celular, a Caveolina-1, está inhibiendo su función.

Con el objetivo de comprender en profundidad el papel de Caveolina-1 en la migración mediada por la actividad de MMP-13, nosotros hemos visto como los ratones deficientes en el gen de la Caveolina-1 tienen acelerado los procesos de reparación de heridas tanto en células en cultivo endoteliales obtenidas de las aortas de estos animales, como en los experimentos con ratones in vivo. El papel de Caveolina-1 en los procesos de migración celular parece encontrarse en controversia, puesto que existen diversos estudios que apuntan al hecho de que es una proteína reguladora negativa de la migración celular y otros que parecen indicar que es un regulador positivo. No obstante, en los ratones deficientes de Caveolina-1, la secreción y la actividad de MMP-2 y MMP-9 está aumentada (Williams, Medina et al. 2004) por lo que, **Caveolina-1 parece estar actuando como un freno del reciclaje de los componentes de la matriz extracelular por las MMPs**. Además en ensayos con el péptido CSD de Caveolina-1, Williams y colaboradores pudieron comprobar la inhibición de la migración celular asociada a estas proteasas (Williams et al, 2004); lo cual parecía indicar que el modo en que la Caveolina-1 pudiera inhibir a MMP-13 en nuestros ensayos sería a través de un mecanismo general de inhibición compartido por otras MMPs. En consonancia con nuestros resultados acerca del

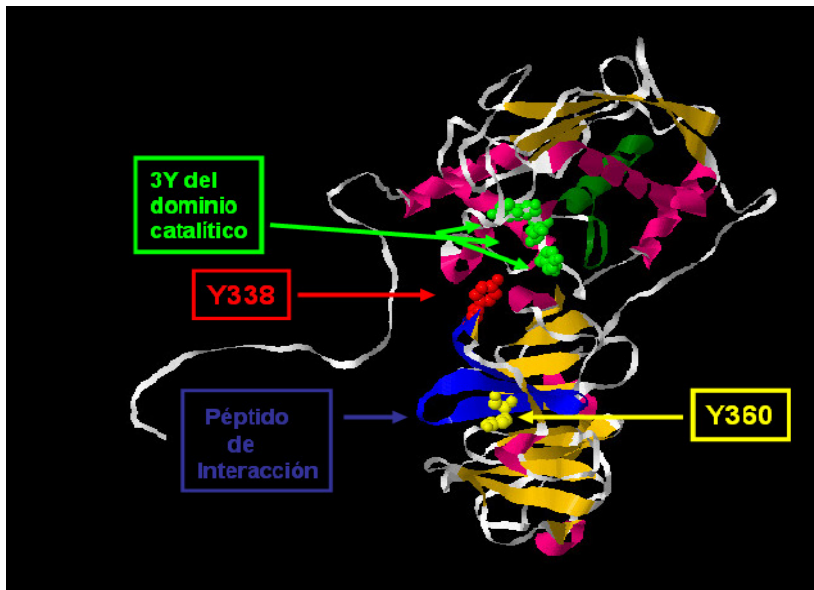
papel represor de Caveolina, se ha descrito a esta molécula como una auténtico supresor de tumores. Existen trabajos en los que se han podido correlacionar una menor expresión de Caveolina-1 en células tumorales junto con un incremento en la secreción de metaloproteasas (Williams, Medina et al. 2004) y en el efecto inhibitorio que la Caveolina-1 ejerce sobre muchos procesos de metástasis (Koleske, Baltimore et al. 1995; Nasu, Timme et al. 1998). Además de lo expresado anteriormente, su papel negativo se ve significativamente reforzado con los trabajos en los que se ha pretendido inducir tumores en los ratones deficientes para Cav-1, los cuales presentan un significativo incremento de los mismos y un dramático ascenso de metástasis de pulmón (Razani, Engelman et al. 2001).

Nosotros hemos visto como el cierre acelerado de las heridas en los animales deficientes para Caveolina-1, se asocia tanto con un aumento en la detección de nitrotirosina como con un aumento en la actividad de MMP-13 en el frente de la herida. El aumento de la nitración podría deberse a un incremento en la actividad de la eNOS, ya que la sintasa se encuentra retenida por la Caveolina-1 de manera que su actividad está inhibida, y por contrario en los ratones deficientes en Caveolina-1 dicha actividad se encuentra significativamente aumentada (Razani, Engelman et al. 2001). El aumento en los niveles de actividad de MMP-13 sugiere que la nitración podría ser requerida no sólo para la disociación de Caveolina-1 sino también para la activación proteolítica de MMP13, ya que en los experimentos realizados usando el péptido inhibidor de la nitración de tirosinas observamos una disminución en la actividad de MMP-13 así como una ralentización en el proceso de cierre de las heridas. A pesar de que **todos los experimentos apuntan a la nitración de MMP-13 como uno de los mecanismos más probables de activación de la proteasa por el NO**, no podemos excluir el hecho de que el NO pueda estar induciendo una modificación postraduccional de otro tipo como la S-Nitrosilación de cisteínas, mecanismo que ha sido descrito para MMP-9 como el inductor de su actividad en el sistema nervioso central (Gu, Kaul et al. 2002). Tampoco podemos excluir la idea de que MMP-13 se asocie con otras proteínas, además de hacerlo con Caveolina-1 y que ejerza un mecanismo a ese nivel.

Estudios previos han explorado qué requerimientos estructurales son precisos para la unión del CSD de Caveolina-1 a otras proteínas, comprobando que al menos 4 ó 5 de los residuos críticos para la unión son de tipo aromático (Residuos del CSD F89, F92, W98, F99), sugiriendo que las interacciones han de ser fundamentalmente hidrofóbicas (Couet, Li et al. 1997). A partir del modelo en 3D del dominio hemopexina y del dominio carboxi-terminal de la proteasa de MMP-13 humana (Fig1) nosotros somos capaces de hacer una predicción estructural, observando que los residuos F347, F349, y F354 junto con Y338, se unen en un grupo para formar un bolsillo hidrofóbico, orientado hacia la cara externa de la proteína del dominio HP. La posición relativa de estas cadenas de aminoácidos de tipo aromático sugiere que el CSD F89 podría interaccionar con Y338 de MMP-13 a través de fuerzas hidrofóbicas y

de Van Der Waals. La nitración de Y338 MMP-13 podría estar aboliendo esta interacción probablemente reduciendo la hidrofobicidad y por lo tanto rompiendo el anillo de tipo hidrofóbico del dominio HP de MMP-13. Dado que muchas de las proteínas que interaccionan con Caveolina-1 lo hacen a través del CSD, podría suceder que las modificaciones de tipo postraduccionales de los residuos que se localizan cerca del bolsillo hidrofóbico fuesen uno de los mecanismos generales de disociación de la Caveolina-1.

A MODELO 3D DEL DOMINIO COOH TERMINAL DE MMP-13



B MODELO 3D DOMINIO HEMOPEXINA MMP-13

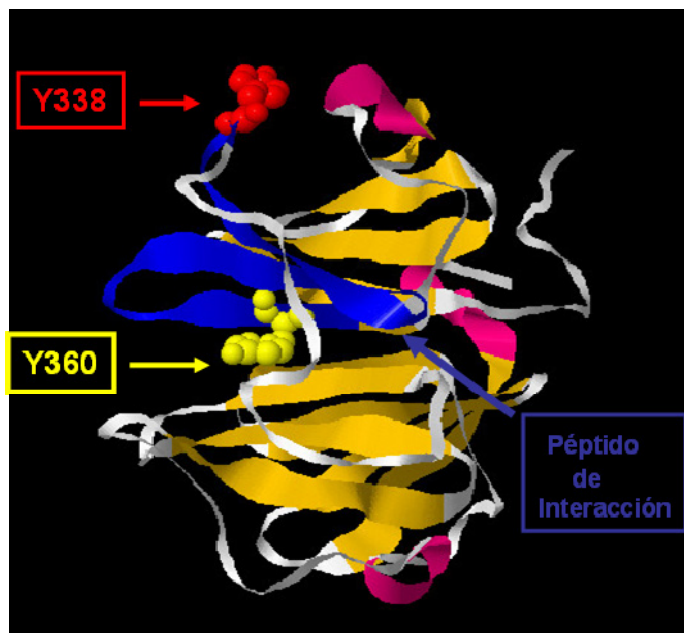


Fig 1. Modelo 3D de la estructura de MMP-13. A) Modelo 3D de la estructura del dominio COOH terminal de MMP-13. B) Modelo 3D de la estructura del dominio hemopexina de MMP-13

Los resultados de los ensayos de cierre de heridas muestran evidencias de que la nitración de MMP-13 en el residuo de tirosina Y338 es uno de los mecanismos funcionales por los que el NO aumenta y activa MMP-13 durante la migración y los procesos de reparación de heridas. En estos experimentos el efecto del inhibidor de la nitración de las tirosinas, muestra que la nitración de esta proteína es parcialmente necesaria para los procesos de cierre, aunque a la luz de los datos inmunohistoquímicos no podemos descartar que existan otras proteínas que pudieran nitrarse durante estos procesos. No obstante, mediante técnicas inmunohistoquímicas con anticuerpos anti nitro tirosina vemos que en los procesos de cierre de herida existe colocalización entre la expresión de MMP-13 y la nitración de la misma. Se sabe que la principal fuente de peroxinitrito necesaria en los procesos de nitración in vivo es la producción combinada de NO y radical superóxido bajo condiciones de estrés, exactamente el cuadro que se presenta en los procesos de reparación de heridas. En nuestro trabajo correlacionamos la importancia de la nitración, una modificación de tipo postraducional que se ha descrito en diversas patologías capaz de modular la actividad de distintas proteínas, como el Alzheimer o el Parkinson, y las enfermedades cardiovasculares (Turko and Murad 2002) junto con la implicación del NO durante los procesos de reparación de heridas que también se había descrito ampliamente. Se sabe que el NO es un factor que actúa como anti – apoptótico de las células que forman parte de la dermis y de la epidermis y también se ha descrito que los ratones deficientes para eNOS y para iNOS, presentan una ralentización en los procesos de cierre de heridas (Yamasaki, Edington et al. 1998; Lee, Salyapongse et al. 1999); (Isenberg, Ridnour et al. 2005). Trabajos previos habían descrito la importancia del NO proveniente de la ruta iNOS, en los procesos de reepitelización comprobando que la expresión de la enzima sintasa iNOS se encuentra elevada durante las fases iniciales del cierre de las heridas y es responsable del aumento de la producción de NO jugando un papel beneficioso en los procesos de reparación (Tatemichi, Ogura et al. 2003). Nosotros hemos encontrado que **en los ratones carentes de iNOS que no producen NO bajo situaciones de stress oxidativo, los niveles de nitración de proteínas son muy reducidos**, así como **la actividad de MMP-13**, siendo este patrón muy similar al que hemos encontrado en los ratones deficientes en MMP-13.

La nitración de la tirosina Y338 de MMP-13 es un mecanismo por el cual el NO está rompiendo la interacción entre Caveolina-1 y MMP-13 y hace que las células inicien la migración. De las dos tirosinas que flanquean el CSD-BD a Caveolina-1: Y338 Y Y360, hemos visto como la tirosina Y338 es necesaria para su interacción a Caveolina-1 pero no la tirosina Y360. La tirosina Y338 es la única capaz de nitrarse en los experimentos in vitro a dosis fisiológicamente relevantes de peroxinitrito. A pesar de que MMP-13 contiene diversos residuos que son dianas potenciales para la nitración, los experimentos realizados de migración en una monocapa de células en cultivo transfecando los distintos dominios de la proteasa confirmaron que el dominio hemopexina estaba implicado en la migración celular, demostrando

así que este dominio es fundamental para la proteasa y que la nitración del mismo está asociada con un incremento en la actividad de MMP-13. La importancia del dominio hemopexina dentro de la familia de las metaloproteasas está descrito evolutivamente, ya que a pesar de que prácticamente todos los dominios se encuentran conservados, se cree que a partir de este dominio el resto de MMPs se diversificaron y progresaron de forma independiente unas a otras. Evolutivamente, el origen de este dominio podría localizarse antes del desarrollo de los animales vertebrados desde los invertebrados y existe en todas las metaloproteasas a excepción de MMP-7, llevando a cabo funciones de las proteasas esenciales para su funcionalidad: a través de este dominio son capaces de unirse al inhibidor de las MMPs (TIMPs), se anclan a sustratos específicos, así como para la activación de membranas y está implicado en algunas actividades proteolíticas (Mysliwy, Dingley et al. 2006).

Para comprender a fondo la importancia de nuestro trabajo, hay que tener en cuenta el **papel fundamental** que desempeña **MMP-13 durante el remodelado de tejidos y la proteólisis de la ECM**. MMP-13 está implicada en la degradación de colágeno que es requerida para la migración de los queratinocitos en cultivo (Pilcher, Dumin et al. 1997) e “in vivo” y se ha podido comprobar, que los queratinocitos que se encuentran migrando presentan una elevada expresión de MMP-13 en el frente final de la herida durante la fase temprana del proceso de reparación (Madlener, Parks et al. 1998). Además, la secreción de MMP-13 por los fibroblastos dermales en el tejido granular (Wu, Jansen et al. 2003) parecen otorgar a MMP-13 un importante papel en la reparación de las heridas, proceso en el que el NO se encuentra involucrado y hasta el momento, la base molecular del proceso es desconocida.

Todo lo expuesto anteriormente pone de manifiesto la especial relación que existe entre el **NO y MMP-13** en la migración y la reparación tisular. No obstante, el soporte fundamental sobre el que se sustenta el peso de MMP-13 en estos procesos radica en los resultados obtenidos con los animales que no expresan dicho gen. Los resultados obtenidos en estos ratones además verifican los datos anteriores, en los que experimentos en los que se suprimió el dominio hemopexina de las MMPs produjo en el caso de la subfamilia de las colagenasas, una pérdida de su capacidad para romper la triple hélice de colágeno, aunque no afectó de forma significativa a sus capacidades de degradar gelatina, caseína u otros sustratos de tipo sintéticos (Sternlicht and Werb 2001; Netzel-Arnett, Currie et al. 2006). En ratones que sobreexpresaban un tipo de colágeno I incapaz de ser escindido por MMP-13 presentaron una ralentización del cierre de las heridas de casi 1 semana respecto a los ratones de fenotipo salvaje (Beare, O’Kane et al. 2003).

Nosotros hemos visto cómo la expresión de MMP-13 es fundamental durante los procesos de reparación de herida en los ratones salvajes, en experimentos in vivo y cómo esta metaloproteasa presenta un patrón de expresión fundamental en el borde de la herida. **Los ratones deficientes para MMP-13, sin embargo, presentan un retardo en los procesos de migración de las células y una ralentización en el cierre de las heridas.** A la vista de los

hallazgos encontrados postulamos que MMP-13 es una proteasa fundamental en los procesos de cierre de heridas, y podría considerarse como una diana terapéutica natural, cuya activación implica efectos muy beneficiosos a nivel local durante los procesos de reendotelización celular.

5.2. BLOQUE II

Aneurismas de Aorta

Hasta el momento, hemos visto que el NO es capaz de ejercer una función clara en un proceso fisiopatológico como es el movimiento celular, presente en distintas situaciones. Este efecto puede ser beneficioso o perjudicial, dependiendo del contexto fisiológico en el que se produzca el movimiento. Así en la angiogénesis que tiene lugar durante el desarrollo, el NO ejerce un efecto positivo para la formación de los nuevos vasos (Kuwabara, Kakinuma et al. 2006). Sin embargo hay determinadas situaciones fisiopatológicas, como durante la metástasis dónde este efecto es negativo. A este respecto nosotros nos preguntamos cuál sería el efecto del NO en un contexto patológico del sistema cardiovascular, eligiendo para ello una patología en la que el NO está presente como son los AAA (Lee, Borhani et al. 2001).

De entre las distintas técnicas por las que se puede inducir un AAA, hemos elegido la perfusión de elastasa en ratones por ser el método que mejor reproduce la sintomatología en humanos. Gracias a esto hemos sido capaces de extrapolar los datos obtenidos en los ratones a lo que sucede en los humanos con el objeto de averiguar las posibles equivalencias entre ambas especies y tratar de obtener resultados satisfactorios que puedan ser de ayuda en el conocimiento de cómo el NO puede estar influyendo en el desarrollo de la enfermedad.

El efecto del NO se ha estudiado en diversas patologías habiéndose encontrado un papel dual para el mismo. Mientras que el NO sintetizado por iNOS se ha implicado en el adelgazamiento de la capa íntima de las aortas seguido de daño vascular (Chyu, Dimayuga et al. 1999), así como en la progresión de las placas ateroscleróticas (Detmers, Hernandez et al. 2000), atribuyéndosele un **papel perjudicial en el desarrollo de determinadas patologías** el NO producido por la óxido Nítrico sintasa endotelial (eNOS) parece tener un **papel protector** frente al desarrollo patológico. Nuestros resultados se encuentran en consonancia con los estudios que existen hasta el momento, los cuales atribuyen al NO sintetizado por iNOS, un papel dañino en el desarrollo de patologías cardiovasculares.

Uno de los efectos de la expresión de iNOS es el de la nitración “inespecífica” de proteínas (Turko and Murad 2002), fenómeno que hemos detectado claramente en las dos especies estudiadas, (Miller, Sharp et al. 2002). Trabajos llevados a cabo por otros investigadores también detectan unos niveles de nitración extensos, (Miller, Sharp et al. 2002) en los que se han observado niveles elevados de nitrotirosina locales en aortas de pacientes con

aneurismas, o trabajos, en los que usando inhibidores específicos de la sintasa iNOS como el aminoguanidinio eran capaces de reducir el desarrollo de las aneurismas cerebrales saculares, en un modelo de ratas hipertensas (Fukuda, Hashimoto et al. 2000; Johanning, Franklin et al. 2001). Nuestro trabajo previo de investigación ha puesto de manifiesto cómo durante el fenómeno de reparación tisular existen unos niveles elevados de nitración, que se correlacionan directamente con la activación de MMP-13, metaloproteasa necesaria para el cierre de las heridas.

Llegados a este punto en la discusión debemos hacer una referencia de forma obligada a un estudio previo al nuestro en ratones en los que de forma similar se inducen AAA, (Lee, Borhani et al. 2001). Mediante el uso de ratones de fenotipo salvaje y deficiente para iNOS, la conclusión a la que llegan los autores es que no encuentran cambios morfológicos significativos entre ambos ratones. Sin embargo y de forma contradictoria a este hecho, los niveles de nitración detectados en los ratones WT son elevados al igual que lo sucedido en nuestro estudio, de lo que los autores infieren que parece poco probable que unos niveles elevados de NO producidos en las paredes de las aortas y los niveles tan elevados de nitración que observan en las proteínas sea un evento inocuo. Siendo los aneurismas una enfermedad relacionada con la edad, que afecta a la mayoría de los pacientes comprendidos en edades a partir de 50 años, y teniendo en cuenta que la edad es un factor determinante en esta patología, que produce desregulaciones en los mediadores de los procesos de inflamación, así como en la expresión de iNOS que es una de las fuentes de los efectos deletéreos, las diferencias entre ambos trabajos pueden ser atribuidas a este factor. En nuestro trabajo los ratones de experimentación tienen una edad entre 45-50 semanas (longevos) mientras que en el trabajo comentado usaron animales comprendidos entre 10-12 semanas (jóvenes) (Lee, Borhani et al. 2001).

Si bien es cierto que podemos determinar una contribución deletérea del NO en una patología cardiovascular, lo realmente novedoso de nuestros hallazgos está en el aspecto mecanístico del proceso detectando la **relación directa** que existe entre el **NO y la expresión de iNOS, MMP-13, y EMMPRIN**. En el trabajo previamente descrito en el primer bloque, hemos visto que MMP-13 se activa por la acción directa del NO sobre la tirosina Y338 de la proteasa nitrándola, habiendo encontrado niveles elevados de peroxinitrito en los procesos de reparación de herida y del marcador nitrotirosina. En los aneurismas humanos y de ratón, hemos encontrado este mismo marcador y una relación directa entre los niveles de iNOS y la activación de MMP-13. Además de estos hallazgos, MMP-13 podría estar funcionando a través de la actividad de EMMPRIN, que entre otras funciones se encuentra involucrada en la activación de distintas metaloproteasas, fundamentalmente en cáncer (Li, Wang et al. 2007), aunque también se ha sido descrito en enfermedades de tipo cardiovascular, como son la aterosclerosis, la hipertensión arterial, los infartos de miocardio, y las apoplejías (Yoon, Kwon

et al. 2005). Sin embargo **hasta el momento, no se había descrito trabajo alguno en el que se hubiera detectado su implicación en AAA.**

Sobre qué regula EMMPRIN en patología cardiovascular, los datos disponibles hacen referencia a hsp60, Clamidia y los agonistas de PPAR como activadores de esta inmunoglobulina (Zhang, Ge et al. 2007). Nosotros hemos encontrado **en las aortas de animales carentes de iNOS, niveles de expresión de EMMPRIN reducidos considerablemente en comparación con los ratones salvajes**, y hemos hallado evidencias in vivo, sobre el efecto directo del NO en la regulación de EMMPRIN, mediando la expresión de las MMPs en los aneurismas de aorta abdominal. Tanto **en las aortas humanas como en las de ratón** encontramos unos **niveles elevados de EMMPRIN y de iNOS**, los cuales, se **correlacionan positivamente con niveles elevados de expresión de MMP-13**. Además para esclarecer que relación existe entre EMMPRIN y la regulación de MMP-13, los ensayos en aorta de ratón ponen en evidencia el papel regulador de EMMPRIN en la activación de MMP-13.

Una de las hipótesis que barajamos sobre la regulación de MMP-13 por EMMPRIN se centra en que EMMPRIN se encuentra asociado a Caveolina-1 en diversos tipos celulares, incluyendo las células endoteliales de aorta y las células de músculo liso, y esta interacción deja a CD 147 en un estado inhibido a través de la inhibición de su glicosilación (como hemos visto que ocurre en la interacción de Caveolina-1 con MMP-13 en el trabajo anterior). Estudios previos al nuestro mostraron que la glicosilación de EMMPRIN es necesaria para la activación de las MMPs sobre las que actúa (Sun and Hemler 2001) y aunque se precisan más datos para tratar de discernir el mecanismo exacto de activación de EMMPRIN a través de NO, podríamos pensar que igualmente que el NO es capaz de activar MMP-13 disociándolo de su unión a Caveolina-1, en determinados procesos de estrés oxidativo donde los niveles de NO están aumentados, EMMPRIN también podría estar regulando la activación de MMP-13, a través de la disociación del complejo EMMPRIN/Caveolina-1, lo que permitiría la activación de EMMPRIN, y esto la activación directa de MMP-13. Por otra parte, dado que en la caveola también se localiza MT1-MMP y está descrito que MT1-MMP se activa por EMMPRIN en las células del músculo liso y en los monocitos, el NO podría activar EMMPRIN, que a su vez activaría MT1-MMP y ésta a MMP-13 como ya se ha descrito previamente (Knauper, Will et al. 1996). En cualquier caso, la activación de EMMPRIN en el contexto de los AAA, tiene como consecuencia la activación de una cascada proteolítica (incluyendo a MMP-2, MMP-9, MMP-13), encaminada a degradar la estructura del vaso. Finalmente, no podemos excluir que el efecto del NO en la activación de MMPs se induzca a través de modificaciones de tipo postraducional como pasa en el caso de otras metaloproteinasas (Gu, Kaul et al. 2002).

En relación con lo mencionado anteriormente, debemos tener en cuenta que las células que no expresan caveolina.-1, sí expresan EMMPRIN, lo que significa que la regulación de esta

inmunoglobulina no es única ni excluyente de otras posibles formas de activación de la molécula. Las rutas descritas hasta el momento de regulación de EMMPRIN son escasas. No obstante está descrito que en células tumorales pancreáticas la ciclofilina A se une a su receptor en la células (EMMPRIN) y esta unión media la activación de una ruta de señalización a través de MAPK (particularmente ERK1/2), que a su vez permite la activación de p38 por fosforilación (Li, Zhai et al. 2006). Se sabe que muchas MMPs se regulan transcripcionalmente a través de p38, y este también podría ser el caso para MMP-13 en este contexto.

Nuestro estudio muestra por primera vez, la implicación de EMMPRIN en la progresión de los AAA y el papel central del NO mediando la expresión de MMP-13 en esta patología. El estudio de las MMPs y su posibles mecanismos de activación en el desarrollo de las aneurismas, es de máxima importancia, porque a pesar de que los aneurismas son patologías multifactoriales, en los que ocurren múltiples procesos degenerativos, las proteasas que degradan la matriz extracelular son determinantes en el desarrollo y progresión del proceso. Nuestro esfuerzo en la actualidad se centra en intentar **averiguar si EMMPRIN, puede ser considerado como un marcador de AAA**, gracias al cual se pudiera llegar a **predecir de forma precoz** la posible ocurrencia de un evento de este tipo en humanos. Además el llegar a controlar los mecanismos que están envueltos en la regulación de la disponibilidad de EMMPRIN y en la glicosilación del mismo, podría ser crucial para el tratamiento de esta patología y aquellas en las que EMMPRIN se encuentra implicada de manera directa.

6. CONCLUSIONES

6. CONCLUSIONES

1. El NO induce la migración celular mediante la activación de MMP-13

1. Las células endoteliales se mueven en respuesta al NO a través de MMP-13, proteasa que se asocia en la membrana plasmática celular con Caveolina-1 en las caveolas, a través del dominio hemopexina de MMP-13 y el CSD (Caveolin Scaffolding Domain) de Caveolina-1. La secuencia responsable de la interacción a Caveolina-1 en el dominio hemopexina de MMP-13, es la siguiente “YEHPSHDLIFIFRGRKFWALNGY “(CBD- Caveolin-1 Binding Domain).
2. El NO rompe el complejo entre el dominio hemopexina de MMP-13 y Caveolina-1, permitiendo la secreción de MMP-13 de la caveola al exterior celular y su posterior activación.
3. El residuo de Y338 del CBD de MMP-13 y no la Y360, es fundamental para el anclaje de MMP-13 a Caveolina-1 y es susceptible de ser nitrada por el NO. Dicha modificación postraducional en la Y338 de MMP-13 activa la proteasa en el espacio extracelular.
4. La relevancia fisiológica in vivo, de la nitración de MMP-13 en los procesos de reendotelización tisular en ratones, fue corroborada, al observar cómo los ratones deficientes en Caveolina-1 están favorecidos en los procesos de cierre de heridas frente a los de fenotipo salvaje, careciendo MMP-13 de su anclaje natural, y presentando una mayor capacidad nitrante debido a una mayor expresión de la enzima óxido nítrico sintasa endotelial (eNOS), siendo sensibles a los tratamientos de inhibición de su nitración. En contra, los ratones deficientes en el gen de la óxido nítrico sintasa inducible, así como los deficientes en el gen de MMP-13, tienen inhibidos los procesos de reparación tisular, con los niveles de nitración disminuidos los primeros, y presentando ambos una insensibilidad a la inhibición de la nitración.

2. La ausencia de NO protege frente al desarrollo de aneurismas de aortas

5. Ratones deficientes para el gen iNOS se encuentran protegidos frente al desarrollo de AAA. En muestras de pacientes con dicha patología se encuentra una correlación entre los niveles de iNOS y el diámetro de engrosamiento de la aorta.
6. La ausencia de NO, conlleva una falta significativa de MMP-13 y de EMMPRIN así como una disminución en los niveles de nitrotirosina que se encuentran en los tejidos aórticos dañados tanto en los ratones como en las muestras de pacientes humanos.
7. EMMPRIN induce la activación de MMP-13 y se encuentra sobreexpresado en ratones de fenotipo salvaje y en muestras de aneurismas humanos.

7. BIBLIOGRAFÍA

7. BIBLIOGRAFÍA

- Aicher, A., C. Heeschen, et al. (2003). "Essential role of endothelial nitric oxide synthase for mobilization of stem and progenitor cells." Nat Med **9**(11): 1370-6.
- Ailawadi, G., J. L. Eliason, et al. (2003). "Current concepts in the pathogenesis of abdominal aortic aneurysm." J Vasc Surg **38**(3): 584-8.
- Albina, J. E., C. D. Mills, et al. (1990). "Temporal expression of different pathways of 1-arginine metabolism in healing wounds." J Immunol **144**(10): 3877-80.
- Alderton, W. K., C. E. Cooper, et al. (2001). "Nitric oxide synthases: structure, function and inhibition." Biochem J **357**(Pt 3): 593-615.
- Allen, P. I., D. Gourevitch, et al. (1987). "Population screening for aortic aneurysms." Lancet **2**(8561): 736.
- Anderson, T. J., A. Uehata, et al. (1995). "Close relation of endothelial function in the human coronary and peripheral circulations." J Am Coll Cardiol **26**(5): 1235-41.
- Bagasra, O., F. H. Michaels, et al. (1995). "Activation of the inducible form of nitric oxide synthase in the brains of patients with multiple sclerosis." Proc Natl Acad Sci U S A **92**(26): 12041-5.
- Beare, A. H., S. O'Kane, et al. (2003). "Severely impaired wound healing in the collagenase-resistant mouse." J Invest Dermatol **120**(1): 153-63.
- Beckman, J. S. (1996). "Oxidative damage and tyrosine nitration from peroxynitrite." Chem Res Toxicol **9**(5): 836-44.
- Beckman, J. S., J. Chen, et al. (1994). "Reactions of nitric oxide, superoxide and peroxynitrite with superoxide dismutase in neurodegeneration." Prog Brain Res **103**: 371-80.
- Beekman, B., J. W. Drijfhout, et al. (1999). "Fluorogenic MMP activity assay for plasma including MMPs complexed to alpha 2-macroglobulin." Ann N Y Acad Sci **878**: 150-8.
- Bode, W., L. F. Kress, et al. (1994). "The crystal structure of adamalysin II, a zinc-endopeptidase from the snake venom of the eastern diamondback rattlesnake *Crotalus adamanteus*." Braz J Med Biol Res **27**(8): 2049-68.
- Bode, W., P. Reinemer, et al. (1994). "The X-ray crystal structure of the catalytic domain of human neutrophil collagenase inhibited by a substrate analogue reveals the essentials for catalysis and specificity." Embo J **13**(6): 1263-9.
- Boodhwani, M., N. R. Sodha, et al. (2007). "Functional, cellular, and molecular characterization of the angiogenic response to chronic myocardial ischemia in diabetes." Circulation **116**(11 Suppl): I31-7.
- Bordador, L. C., X. Li, et al. (2000). "Expression of emmprin by oral squamous cell carcinoma." Int J Cancer **85**(3): 347-52.
- Bostrom, P. J., L. Ravanti, et al. (2000). "Expression of collagenase-3 (matrix metalloproteinase-13) in transitional-cell carcinoma of the urinary bladder." Int J Cancer **88**(3): 417-23.

- Bown, M. J., P. R. Burton, et al. (2003). "The role of cytokine gene polymorphisms in the pathogenesis of abdominal aortic aneurysms: a case-control study." J Vasc Surg **37**(5): 999-1005.
- Bredt, D. S. and S. H. Snyder (1990). "Isolation of nitric oxide synthetase, a calmodulin-requiring enzyme." Proc Natl Acad Sci U S A **87**(2): 682-5.
- Brew, K., D. Dinakarbandian, et al. (2000). "Tissue inhibitors of metalloproteinases: evolution, structure and function." Biochim Biophys Acta **1477**(1-2): 267-83.
- Brinckerhoff, C. E. and L. M. Matrisian (2002). "Matrix metalloproteinases: a tail of a frog that became a prince." Nat Rev Mol Cell Biol **3**(3): 207-14.
- Brown, D. A. and E. London (1998). "Functions of lipid rafts in biological membranes." Annu Rev Cell Dev Biol **14**: 111-36.
- Cassella, J. P., J. G. Lawrenson, et al. (1996). "Ontogeny of four blood-brain barrier markers: an immunocytochemical comparison of pial and cerebral cortical microvessels." J Anat **189** (Pt 2): 407-15.
- Castro, L., M. Rodriguez, et al. (1994). "Aconitase is readily inactivated by peroxynitrite, but not by its precursor, nitric oxide." J Biol Chem **269**(47): 29409-15.
- Couet, J., S. Li, et al. (1997). "Identification of peptide and protein ligands for the caveolin-scaffolding domain. Implications for the interaction of caveolin with caveolae-associated proteins." J Biol Chem **272**(10): 6525-33.
- Crowther, M., S. Goodall, et al. (2000). "Localization of matrix metalloproteinase 2 within the aneurysmal and normal aortic wall." Br J Surg **87**(10): 1391-400.
- Cuaz-Perolin, C., I. Jguirim, et al. (2006). "Apolipoprotein E knockout mice over-expressing human tissue inhibitor of metalloproteinase 1 are protected against aneurysm formation but not against atherosclerotic plaque development." J Vasc Res **43**(6): 493-501.
- Curci, J. A., D. Mao, et al. (2000). "Preoperative treatment with doxycycline reduces aortic wall expression and activation of matrix metalloproteinases in patients with abdominal aortic aneurysms." J Vasc Surg **31**(2): 325-42.
- Chung, P. and L. Hermann (2006). "Acute decompensated heart failure: formulating an evidence-based approach to diagnosis and treatment (part I)." Mt Sinai J Med **73**(2): 506-15.
- Chyu, K. Y., P. Dimayuga, et al. (1999). "Decreased neointimal thickening after arterial wall injury in inducible nitric oxide synthase knockout mice." Circ Res **85**(12): 1192-8.
- Das, S., M. Mandal, et al. (2003). "Structure and evolutionary aspects of matrix metalloproteinases: a brief overview." Mol Cell Biochem **253**(1-2): 31-40.
- Deanfield, J. E., J. P. Halcox, et al. (2007). "Endothelial function and dysfunction: testing and clinical relevance." Circulation **115**(10): 1285-95.
- Dedio, J., P. Konig, et al. (2001). "NOSIP, a novel modulator of endothelial nitric oxide synthase activity." Faseb J **15**(1): 79-89.

- Dedkova, E. N. and L. A. Blatter (2002). "Nitric oxide inhibits capacitative Ca^{2+} entry and enhances endoplasmic reticulum Ca^{2+} uptake in bovine vascular endothelial cells." J Physiol **539**(Pt 1): 77-91.
- Detmers, P. A., M. Hernandez, et al. (2000). "Deficiency in inducible nitric oxide synthase results in reduced atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice." J Immunol **165**(6): 3430-5.
- Dobrin, P. B. and R. Mrkvicka (1994). "Failure of elastin or collagen as possible critical connective tissue alterations underlying aneurysmal dilatation." Cardiovasc Surg **2**(4): 484-8.
- Ellis, S. M., K. Nabeshima, et al. (1989). "Monoclonal antibody preparation and purification of a tumor cell collagenase-stimulatory factor." Cancer Res **49**(12): 3385-91.
- Engelman, J. A., C. Chu, et al. (1998). "Caveolin-mediated regulation of signaling along the p42/44 MAP kinase cascade in vivo. A role for the caveolin-scaffolding domain." FEBS Lett **428**(3): 205-11.
- Feliciano, A., H. S. do Rosario, et al. (1993). "[Vasoactive endothelial factors]." Rev Port Cardiol **12**(6): 557-60, 510-1.
- Folgueras, A. R., A. M. Pendas, et al. (2004). "Matrix metalloproteinases in cancer: from new functions to improved inhibition strategies." Int J Dev Biol **48**(5-6): 411-24.
- Freije, J. M., I. Diez-Itza, et al. (1994). "Molecular cloning and expression of collagenase-3, a novel human matrix metalloproteinase produced by breast carcinomas." J Biol Chem **269**(24): 16766-73.
- Fridman, R., M. Toth, et al. (1995). "Activation of progelatinase B (MMP-9) by gelatinase A (MMP-2)." Cancer Res **55**(12): 2548-55.
- Fukuda, S., N. Hashimoto, et al. (2000). "Prevention of rat cerebral aneurysm formation by inhibition of nitric oxide synthase." Circulation **101**(21): 2532-8.
- Fulton, D., J. P. Gratton, et al. (2001). "Post-translational control of endothelial nitric oxide synthase: why isn't calcium/calmodulin enough?" J Pharmacol Exp Ther **299**(3): 818-24.
- Galis, Z. S., G. K. Sukhova, et al. (1995). "Macrophage foam cells from experimental atheroma constitutively produce matrix-degrading proteinases." Proc Natl Acad Sci U S A **92**(2): 402-6.
- Galvez, B. G., S. Matias-Roman, et al. (2004). "Caveolae are a novel pathway for membrane-type 1 matrix metalloproteinase traffic in human endothelial cells." Mol Biol Cell **15**(2): 678-87.
- Galle, J., T. Hansen-Hagge, et al. (2006). "Impact of oxidized low density lipoprotein on vascular cells." Atherosclerosis **185**(2): 219-26.
- Garcia-Cardena, G., R. Fan, et al. (1996). "Endothelial nitric oxide synthase is regulated by tyrosine phosphorylation and interacts with caveolin-1." J Biol Chem **271**: 27237-27240.

- Garcia-Cardena, G., P. Martasek, et al. (1997). "Dissecting the interaction between nitric oxide synthase (NOS) and caveolin. Functional significance of the nos caveolin binding domain in vivo." J Biol Chem **272**(41): 25437-40.
- Ghosh, D. K. and D. J. Stuehr (1995). "Macrophage NO synthase: characterization of isolated oxygenase and reductase domains reveals a head-to-head subunit interaction." Biochemistry **34**(3): 801-7.
- Gomez, D. E., D. F. Alonso, et al. (1997). "Tissue inhibitors of metalloproteinases: structure, regulation and biological functions." Eur J Cell Biol **74**(2): 111-22.
- Gow, A. J., D. Duran, et al. (1996). "Effects of peroxynitrite-induced protein modifications on tyrosine phosphorylation and degradation." FEBS Lett **385**(1-2): 63-6.
- Grange, J. J., V. Davis, et al. (1997). "Pathogenesis of abdominal aortic aneurysm: an update and look toward the future." Cardiovasc Surg **5**(3): 256-65.
- Gu, Z., M. Kaul, et al. (2002). "S-nitrosylation of matrix metalloproteinases: signaling pathway to neuronal cell death." Science **297**(5584): 1186-90.
- Gunasinghe, S. K., J. Ikonmidis, et al. (2001). "Contributory role of matrix metalloproteinases in cardiovascular remodeling." Curr Drug Targets Cardiovasc Haematol Disord **1**(2): 75-91.
- Guo, H., S. Zucker, et al. (1997). "Stimulation of matrix metalloproteinase production by recombinant extracellular matrix metalloproteinase inducer from transfected Chinese hamster ovary cells." J Biol Chem **272**(1): 24-7.
- Halpert, I., U. I. Sires, et al. (1996). "Matrilysin is expressed by lipid-laden macrophages at sites of potential rupture in atherosclerotic lesions and localizes to areas of versican deposition, a proteoglycan substrate for the enzyme." Proc Natl Acad Sci U S A **93**(18): 9748-53.
- Hassan, G. S., T. M. Williams, et al. (2006). "Caveolin-1-deficient aortic smooth muscle cells show cell autonomous abnormalities in proliferation, migration, and endothelin-based signal transduction." Am J Physiol Heart Circ Physiol **290**(6): H2393-401.
- Herman, M. P., G. K. Sukhova, et al. (2001). "Tissue factor pathway inhibitor-2 is a novel inhibitor of matrix metalloproteinases with implications for atherosclerosis." J Clin Invest **107**(9): 1117-26.
- Isenberg, J. S., L. A. Ridnour, et al. (2005). "Nitric oxide in wound-healing." Microsurgery **25**(5): 442-51.
- Isshiki, M., J. Ando, et al. (2002). "Sites of Ca(2+) wave initiation move with caveolae to the trailing edge of migrating cells." J Cell Sci **115**(Pt 3): 475-84.
- Isshiki, M., Y. S. Ying, et al. (2002). "A molecular sensor detects signal transduction from caveolae in living cells." J Biol Chem **277**(45): 43389-98.
- Jiang, J. L., Q. Zhou, et al. (2001). "The involvement of HAb18G/EMMPRIN in regulation of store-operated calcium entry and metastasis of human hepatoma cells." J Biol Chem **276**(50): 46870-7.

- Johanning, J. M., D. P. Franklin, et al. (2001). "Inhibition of inducible nitric oxide synthase limits nitric oxide production and experimental aneurysm expansion." J Vasc Surg **33**(3): 579-86.
- Johansson, N., U. Saarialho-Kere, et al. (1997). "Collagenase-3 (MMP-13) is expressed by hypertrophic chondrocytes, periosteal cells, and osteoblasts during human fetal bone development." Dev Dyn **208**(3): 387-97.
- Johnston, K. W., R. B. Rutherford, et al. (1991). "Suggested standards for reporting on arterial aneurysms. Subcommittee on Reporting Standards for Arterial Aneurysms, Ad Hoc Committee on Reporting Standards, Society for Vascular Surgery and North American Chapter, International Society for Cardiovascular Surgery." J Vasc Surg **13**(3): 452-8.
- Kahari, V. M., N. Johansson, et al. (1998). "Expression of collagenase-3 (MMP-13) by tumor cells in squamous cell carcinomas of the head and neck." Adv Exp Med Biol **451**: 63-8.
- Kamisaki, Y., K. Wada, et al. (1998). "An activity in rat tissues that modifies nitrotyrosine-containing proteins." Proc Natl Acad Sci U S A **95**(20): 11584-9.
- Kataoka, H., R. DeCastro, et al. (1993). "Tumor cell-derived collagenase-stimulatory factor increases expression of interstitial collagenase, stromelysin, and 72-kDa gelatinase." Cancer Res **53**(13): 3154-8.
- Knauper, V., S. Cowell, et al. (1997). "The role of the C-terminal domain of human collagenase-3 (MMP-13) in the activation of procollagenase-3, substrate specificity, and tissue inhibitor of metalloproteinase interaction." J Biol Chem **272**(12): 7608-16.
- Knauper, V., C. Lopez-Otin, et al. (1996). "Biochemical characterization of human collagenase-3." J Biol Chem **271**(3): 1544-50.
- Knauper, V., H. Will, et al. (1996). "Cellular mechanisms for human procollagenase-3 (MMP-13) activation. Evidence that MT1-MMP (MMP-14) and gelatinase a (MMP-2) are able to generate active enzyme." J Biol Chem **271**(29): 17124-31.
- Koch, C., G. Staffler, et al. (1999). "T cell activation-associated epitopes of EMMPRIN in regulation of the T cell response, and their definition by antibody affinity and antigen density." Int Immunol **11**(5): 777-86.
- Kuwabara, M., Y. Kakinuma, et al. (2006). "Nitric oxide stimulates vascular endothelial growth factor production in cardiomyocytes involved in angiogenesis." J Physiol Sci **56**(1): 95-101.
- Labrecque, L., C. Nyalendo, et al. (2004). "Src-mediated tyrosine phosphorylation of caveolin-1 induces its association with membrane type 1 matrix metalloproteinase." J Biol Chem **279**(50): 52132-40.
- Lechuga, C. G., Z. H. Hernandez-Nazara, et al. (2004). "TGF-beta1 modulates matrix metalloproteinase-13 expression in hepatic stellate cells by complex mechanisms involving p38MAPK, PI3-kinase, AKT, and p70S6k." Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol **287**(5): G974-87.
- Lee, J. K., M. Borhani, et al. (2001). "Experimental abdominal aortic aneurysms in mice lacking expression of inducible nitric oxide synthase." Arterioscler Thromb Vasc Biol **21**(9): 1393-401.
- Lee, M. H. and G. Murphy (2004). "Matrix metalloproteinases at a glance." J Cell Sci **117**(Pt 18): 4015-6.

- Lee, P. C., A. N. Salyapongse, et al. (1999). "Impaired wound healing and angiogenesis in eNOS-deficient mice." Am J Physiol **277**(4 Pt 2): H1600-8.
- Leeman, M. F., S. Curran, et al. (2002). "The structure, regulation, and function of human matrix metalloproteinase-13." Crit Rev Biochem Mol Biol **37**(3): 149-66.
- Li, M., Q. Zhai, et al. (2006). "Cyclophilin A is overexpressed in human pancreatic cancer cells and stimulates cell proliferation through EMMPRIN." Cancer **106**(10): 2284-94.
- Li, Q. Q., W. J. Wang, et al. (2007). "Up-regulation of EMMPRIN and matrix metalloproteinase-2, -9 induced by P-glycoprotein substrates in multidrug resistant breast cancer cells." Cancer Sci **98**(11): 1767-74.
- Li, R., L. Huang, et al. (2001). "Basigin (murine EMMPRIN) stimulates matrix metalloproteinase production by fibroblasts." J Cell Physiol **186**(3): 371-9.
- Li, Y. Y., C. F. McTiernan, et al. (2000). "Interplay of matrix metalloproteinases, tissue inhibitors of metalloproteinases and their regulators in cardiac matrix remodeling." Cardiovasc Res **46**(2): 214-24.
- Liang, L., T. Major, et al. (2002). "Characterization of the promoter of human extracellular matrix metalloproteinase inducer (EMMPRIN)." Gene **282**(1-2): 75-86.
- Liao, M. F., Z. P. Jing, et al. (2006). "Role of nitric oxide and inducible nitric oxide synthase in human abdominal aortic aneurysms: a preliminary study." Chin Med J (Engl) **119**(4): 312-8.
- Lin, S., K. A. Fagan, et al. (2000). "Sustained endothelial nitric-oxide synthase activation requires capacitative Ca²⁺ entry." J Biol Chem **275**(24): 17979-85.
- Lindholt, J. S., S. Vammen, et al. (2000). "The plasma level of matrix metalloproteinase 9 may predict the natural history of small abdominal aortic aneurysms. A preliminary study." Eur J Vasc Endovasc Surg **20**(3): 281-5.
- Lopez-Otin, C. and L. M. Matrisian (2007). "Emerging roles of proteases in tumour suppression." Nat Rev Cancer **7**(10): 800-8.
- Lopez-Rivera, E., T. R. Lizarbe, et al. (2005). "Matrix metalloproteinase 13 mediates nitric oxide activation of endothelial cell migration." Proc Natl Acad Sci U S A **102**(10): 3685-90.
- Madlener, M., W. C. Parks, et al. (1998). "Matrix metalloproteinases (MMPs) and their physiological inhibitors (TIMPs) are differentially expressed during excisional skin wound repair." Exp Cell Res **242**(1): 201-10.
- Manabe, S., Z. Gu, et al. (2005). "Activation of matrix metalloproteinase-9 via neuronal nitric oxide synthase contributes to NMDA-induced retinal ganglion cell death." Invest Ophthalmol Vis Sci **46**(12): 4747-53.
- Mao, D., J. K. Lee, et al. (1999). "Expression of collagenase-3 (MMP-13) in human abdominal aortic aneurysms and vascular smooth muscle cells in culture." Biochem Biophys Res Commun **261**(3): 904-10.
- McCarthy, G. M., P. R. Westfall, et al. (2001). "Basic calcium phosphate crystals activate human osteoarthritic synovial fibroblasts and induce matrix metalloproteinase-13

- (collagenase-3) in adult porcine articular chondrocytes." Ann Rheum Dis **60**(4): 399-406.
- Michel, T. (1999). "Targeting and translocation of endothelial nitric oxide synthase." Braz J Med Biol Res **32**(11): 1361-6.
- Michel, T. and O. Feron (1997). "Nitric oxide synthases: which, where, how, and why?" J Clin Invest **100**(9): 2146-52.
- Miller, F. J., Jr., W. J. Sharp, et al. (2002). "Oxidative stress in human abdominal aortic aneurysms: a potential mediator of aneurysmal remodeling." Arterioscler Thromb Vasc Biol **22**(4): 560-5.
- Mitchell, P. G., H. A. Magna, et al. (1996). "Cloning, expression, and type II collagenolytic activity of matrix metalloproteinase-13 from human osteoarthritic cartilage." J Clin Invest **97**(3): 761-8.
- Moreno, P. R., K. R. Purushothaman, et al. (2006). "Neovascularization in human atherosclerosis." Circulation **113**(18): 2245-52.
- Moro, M. A., V. M. Darley-Usmar, et al. (1994). "Paradoxical fate and biological action of peroxynitrite on human platelets." Proc Natl Acad Sci U S A **91**(14): 6702-6.
- Mott, J. D. and Z. Werb (2004). "Regulation of matrix biology by matrix metalloproteinases." Curr Opin Cell Biol **16**(5): 558-64.
- Muraoka, K., K. Nabeshima, et al. (1993). "Enhanced expression of a tumor-cell-derived collagenase-stimulatory factor in urothelial carcinoma: its usefulness as a tumor marker for bladder cancers." Int J Cancer **55**(1): 19-26.
- Murphy, G. and V. Knauper (1997). "Relating matrix metalloproteinase structure to function: why the "hemopexin" domain?" Matrix Biol **15**(8-9): 511-8.
- Murphy, G. and F. Willenbrock (1995). "Tissue inhibitors of matrix metalloendopeptidases." Methods Enzymol **248**: 496-510.
- Mysliwy, J., A. J. Dingley, et al. (2006). "Structural characterization and binding properties of the hemopexin-like domain of the matrix metalloproteinase-19." Protein Expr Purif **46**(2): 406-13.
- Nagase, H. (1998). "Cell surface activation of progelatinase A (proMMP-2) and cell migration." Cell Res **8**(3): 179-86.
- Nagase, H. and J. F. Woessner, Jr. (1999). "Matrix metalloproteinases." J Biol Chem **274**(31): 21491-4.
- Netzel-Arnett, S., B. M. Currie, et al. (2006). "Evidence for a matrilysin-prostasin proteolytic cascade regulating terminal epidermal differentiation." J Biol Chem **281**(44): 32941-5.
- Newby, A. C., M. Pauschinger, et al. (2006). "From tadpole tails to transgenic mice: metalloproteinases have brought about a metamorphosis in our understanding of cardiovascular disease." Cardiovasc Res **69**(3): 559-61.

- Newman, K. M., Y. Ogata, et al. (1994). "Identification of matrix metalloproteinases 3 (stromelysin-1) and 9 (gelatinase B) in abdominal aortic aneurysm." Arterioscler Thromb **14**(8): 1315-20.
- Nian, M., P. Lee, et al. (2004). "Inflammatory cytokines and postmyocardial infarction remodeling." Circ Res **94**(12): 1543-53.
- Overall, C. M. (2002). "Molecular determinants of metalloproteinase substrate specificity: matrix metalloproteinase substrate binding domains, modules, and exosites." Mol Biotechnol **22**(1): 51-86.
- Overall, C. M. and C. Lopez-Otin (2002). "Strategies for MMP inhibition in cancer: innovations for the post-trial era." Nat Rev Cancer **2**(9): 657-72.
- Page-McCaw, A., A. J. Ewald, et al. (2007). "Matrix metalloproteinases and the regulation of tissue remodelling." Nat Rev Mol Cell Biol **8**(3): 221-33.
- Palombo, D., M. Maione, et al. (1999). "Matrix metalloproteinases. Their role in degenerative chronic diseases of abdominal aorta." J Cardiovasc Surg (Torino) **40**(2): 257-60.
- Peluffo, G. and R. Radi (2007). "Biochemistry of protein tyrosine nitration in cardiovascular pathology." Cardiovasc Res **75**(2): 291-302.
- Perez-De La Cruz, V., C. Gonzalez-Cortes, et al. (2005). "Excitotoxic brain damage involves early peroxynitrite formation in a model of Huntington's disease in rats: protective role of iron porphyrinate 5,10,15,20-tetrakis (4-sulfonatophenyl)porphyrinate iron (III)." Neuroscience **135**(2): 463-74.
- Pike, L. J. (2005). "Growth factor receptors, lipid rafts and caveolae: an evolving story." Biochim Biophys Acta **1746**(3): 260-73.
- Pilcher, B. K., J. A. Dumin, et al. (1997). "The activity of collagenase-1 is required for keratinocyte migration on a type I collagen matrix." J Cell Biol **137**(6): 1445-57.
- Pineda-Molina, E. and S. Lamas (2002). "S-glutathionylation of NF-kappa B subunit p50." Methods Enzymol **359**: 268-79.
- Polette, M., C. Gilles, et al. (1997). "Tumor collagenase stimulatory factor (TCSF) expression and localization in human lung and breast cancers." J Histochem Cytochem **45**(5): 703-9.
- Poppa, V., J. K. Miyashiro, et al. (1998). "Endothelial NO synthase is increased in regenerating endothelium after denuding injury of the rat aorta." Arterioscler Thromb Vasc Biol **18**(8): 1312-21.
- Powell, J. and R. M. Greenhalgh (1989). "Cellular, enzymatic, and genetic factors in the pathogenesis of abdominal aortic aneurysms." J Vasc Surg **9**(2): 297-304.
- Pustovrh, M. C., A. Jawerbaum, et al. (2007). "The role of nitric oxide on matrix metalloproteinase 2 (MMP2) and MMP9 in placenta and fetus from diabetic rats." Reproduction **134**(4): 605-613.
- Puyraimond, A., R. Fridman, et al. (2001). "MMP-2 colocalizes with caveolae on the surface of endothelial cells." Exp Cell Res **262**(1): 28-36.

- Qiu, P., M. Kurpakus-Wheater, et al. (2007). "Matrix metalloproteinase activity is necessary for thymosin beta 4 promotion of epithelial cell migration." J Cell Physiol **212**(1): 165-73.
- Rajagopalan, S., X. P. Meng, et al. (1996). "Reactive oxygen species produced by macrophage-derived foam cells regulate the activity of vascular matrix metalloproteinases in vitro. Implications for atherosclerotic plaque stability." J Clin Invest **98**(11): 2572-9.
- Ravanti, L., L. Hakkinen, et al. (1999). "Transforming growth factor-beta induces collagenase-3 expression by human gingival fibroblasts via p38 mitogen-activated protein kinase." J Biol Chem **274**(52): 37292-300.
- Razani, B., J. A. Engelman, et al. (2001). "Caveolin-1 null mice are viable but show evidence of hyperproliferative and vascular abnormalities." J Biol Chem **276**(41): 38121-38.
- Razani, B., S. E. Woodman, et al. (2002). "Caveolae: from cell biology to animal physiology." Pharmacol Rev **54**(3): 431-67.
- Reboul, P., J. P. Pelletier, et al. (1996). "The new collagenase, collagenase-3, is expressed and synthesized by human chondrocytes but not by synoviocytes. A role in osteoarthritis." J Clin Invest **97**(9): 2011-9.
- Reed, D., C. Reed, et al. (1992). "Are aortic aneurysms caused by atherosclerosis?" Circulation **85**(1): 205-11.
- Richards, M. K. and M. A. Marletta (1994). "Characterization of neuronal nitric oxide synthase and a C415H mutant, purified from a baculovirus overexpression system." Biochemistry **33**(49): 14723-32.
- Rothberg, K. G., J. E. Heuser, et al. (1992). "Caveolin, a protein component of caveolae membrane coats." Cell **68**(4): 673-82.
- Saari, H., K. Suomalainen, et al. (1990). "Activation of latent human neutrophil collagenase by reactive oxygen species and serine proteases." Biochem Biophys Res Commun **171**(3): 979-87.
- Sameshima, T., K. Nabeshima, et al. (2000). "Expression of emmprin (EMMPRIN), a cell surface inducer of matrix metalloproteinases, in normal human brain and gliomas." Int J Cancer **88**(1): 21-7.
- Sameshima, T., K. Nabeshima, et al. (2000). "Glioma cell extracellular matrix metalloproteinase inducer (EMMPRIN) (EMMPRIN) stimulates production of membrane-type matrix metalloproteinases and activated gelatinase A in co-cultures with brain-derived fibroblasts." Cancer Lett **157**(2): 177-84.
- Sato, H., T. Takino, et al. (1994). "A matrix metalloproteinase expressed on the surface of invasive tumour cells." Nature **370**(6484): 61-5.
- Saura, M., C. Zaragoza, et al. (2002). "Smad2 mediates transforming growth factor-beta induction of endothelial nitric oxide synthase expression." Circ Res **91**(9): 806-13.
- Schmidt, R., A. Bultmann, et al. (2006). "Extracellular matrix metalloproteinase inducer regulates matrix metalloproteinase activity in cardiovascular cells: implications in acute myocardial infarction." Circulation **113**(6): 834-41.

- Schonthal, A., P. Herrlich, et al. (1988). "Requirement for fos gene expression in the transcriptional activation of collagenase by other oncogenes and phorbol esters." Cell **54**(3): 325-34.
- Seifter, E., G. Rettura, et al. (1978). "Arginine: an essential amino acid for injured rats." Surgery **84**(2): 224-30.
- Shabani, M., S. K. Pulfer, et al. (1996). "Enhancement of wound repair with a topically applied nitric oxide-releasing polymer." Wound Repair Regen **4**(3): 353-62.
- Shaul, P. W. and R. G. Anderson (1998). "Role of plasmalemmal caveolae in signal transduction." Am J Physiol **275**(5 Pt 1): L843-51.
- Shaul, P. W., E. J. Smart, et al. (1996). "Acylation targets endothelial nitric-oxide synthase to plasmalemmal caveolae." J Biol Chem **271**(11): 6518-22.
- Simons, K. and D. Toomre (2000). "Lipid rafts and signal transduction." Nat Rev Mol Cell Biol **1**(1): 31-9.
- Sowa, G., M. Pypaert, et al. (2001). "Distinction between signaling mechanisms in lipid rafts vs. caveolae." Proc Natl Acad Sci USA **98**: 14072–14077.
- Spinale, F. G. (2002). "Matrix metalloproteinases: regulation and dysregulation in the failing heart." Circ Res **90**(5): 520-30.
- Spinale, F. G. (2007). "Myocardial matrix remodeling and the matrix metalloproteinases: influence on cardiac form and function." Physiol Rev **87**(4): 1285-342.
- Spinale, F. G., H. Gunasinghe, et al. (2002). "Extracellular degradative pathways in myocardial remodeling and progression to heart failure." J Card Fail **8**(6 Suppl): S332-8.
- Springman, E. B., E. L. Angleton, et al. (1990). "Multiple modes of activation of latent human fibroblast collagenase: evidence for the role of a Cys73 active-site zinc complex in latency and a "cysteine switch" mechanism for activation." Proc Natl Acad Sci U S A **87**(1): 364-8.
- Stahle-Backdahl, M., B. Sandstedt, et al. (1997). "Collagenase-3 (MMP-13) is expressed during human fetal ossification and re-expressed in postnatal bone remodeling and in rheumatoid arthritis." Lab Invest **76**(5): 717-28.
- Stallmeyer, B., H. Kampfer, et al. (1999). "The function of nitric oxide in wound repair: inhibition of inducible nitric oxide-synthase severely impairs wound reepithelialization." J Invest Dermatol **113**(6): 1090-8.
- Stan, R. V. (2005). "Structure of caveolae." Biochim Biophys Acta **1746**(3): 334-48.
- Sternlicht, M. D. and Z. Werb (2001). "How matrix metalloproteinases regulate cell behavior." Annu Rev Cell Dev Biol **17**: 463-516.
- Sun, J. and M. E. Hemler (2001). "Regulation of MMP-1 and MMP-2 production through EMMPRIN/extracellular matrix metalloproteinase inducer interactions." Cancer Res **61**(5): 2276-81.
- Sun, Y., J. M. Cheung, et al. (2000). "Wild type and mutant p53 differentially regulate the gene expression of human collagenase-3 (hMMP-13)." J Biol Chem **275**(15): 11327-32.

- Suzuki, S., M. Sato, et al. (2004). "Direct cell-cell interaction enhances pro-MMP-2 production and activation in co-culture of laryngeal cancer cells and fibroblasts: involvement of EMMPRIN and MT1-MMP." Exp Cell Res **293**(2): 259-66.
- Tang, W., S. B. Chang, et al. (2004). "Links between EMMPRIN function, glycosylation, and caveolin-1." Mol Biol Cell **15**(9): 4043-50.
- Tang, W. and M. E. Hemler (2004). "Caveolin-1 regulates matrix metalloproteinases-1 induction and EMMPRIN/EMMPRIN cell surface clustering." J Biol Chem **279**(12): 11112-8.
- Tatemichi, M., T. Ogura, et al. (2003). "Roles of inducible nitric oxide synthase in the development and healing of experimentally induced gastric ulcers." Int J Exp Pathol **84**(5): 213-20.
- Thompson, R. W. and B. T. Baxter (1999). "MMP inhibition in abdominal aortic aneurysms. Rationale for a prospective randomized clinical trial." Ann N Y Acad Sci **878**: 159-78.
- Thompson, R. W., D. R. Holmes, et al. (1995). "Production and localization of 92-kilodalton gelatinase in abdominal aortic aneurysms. An elastolytic metalloproteinase expressed by aneurysm-infiltrating macrophages." J Clin Invest **96**(1): 318-26.
- Turko, I. V. and F. Murad (2002). "Protein nitration in cardiovascular diseases." Pharmacol Rev **54**(4): 619-34.
- Uitto, V. J., K. Airola, et al. (1998). "Collagenase-3 (matrix metalloproteinase-13) expression is induced in oral mucosal epithelium during chronic inflammation." Am J Pathol **152**(6): 1489-99.
- Uttenthal, L. O., D. Alonso, et al. (1998). "Neuronal and inducible nitric oxide synthase and nitrotyrosine immunoreactivities in the cerebral cortex of the aging rat." Microsc Res Tech **43**(1): 75-88.
- Vaalamo, M., M. Weckroth, et al. (1996). "Patterns of matrix metalloproteinase and TIMP-1 expression in chronic and normally healing human cutaneous wounds." Br J Dermatol **135**(1): 52-9.
- Van den Oord, J. J., L. Paemen, et al. (1997). "Expression of gelatinase B and the extracellular matrix metalloproteinase inducer EMMPRIN in benign and malignant pigment cell lesions of the skin." Am J Pathol **151**(3): 665-70.
- Van Wart, H. E. and H. Birkedal-Hansen (1990). "The cysteine switch: a principle of regulation of metalloproteinase activity with potential applicability to the entire matrix metalloproteinase gene family." Proc Natl Acad Sci U S A **87**(14): 5578-82.
- Vincenti, M. P. (2001). "The matrix metalloproteinase (MMP) and tissue inhibitor of metalloproteinase (TIMP) genes. Transcriptional and posttranscriptional regulation, signal transduction and cell-type-specific expression." Methods Mol Biol **151**: 121-48.
- Visse, R. and H. Nagase (2003). "Matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases: structure, function, and biochemistry." Circ Res **92**(8): 827-39.
- Werb, Z. (1997). "ECM and cell surface proteolysis: regulating cellular ecology." Cell **91**(4): 439-42.

- Westhoff, C. S., D. Freudiger, et al. (1999). "Characterization of collagenase 3 (matrix metalloproteinase 13) messenger RNA expression in the synovial membrane and synovial fibroblasts of patients with rheumatoid arthritis." Arthritis Rheum **42**(7): 1517-27.
- Williams, T. M., F. Medina, et al. (2004). "Caveolin-1 gene disruption promotes mammary tumorigenesis and dramatically enhances lung metastasis in vivo. Role of Cav-1 in cell invasiveness and matrix metalloproteinase (MMP-2/9) secretion." J Biol Chem **279**(49): 51630-46.
- Willmroth, F., H. H. Peter, et al. (1998). "A matrix metalloproteinase gene expressed in human T lymphocytes is identical with collagenase 3 from breast carcinomas." Immunobiology **198**(4): 375-84.
- Wills, A., M. M. Thompson, et al. (1996). "Pathogenesis of abdominal aortic aneurysms--cellular and biochemical mechanisms." Eur J Vasc Endovasc Surg **12**(4): 391-400.
- Witte, M. B., T. Kiyama, et al. (2002). "Nitric oxide enhances experimental wound healing in diabetes." Br J Surg **89**(12): 1594-601.
- Woessner, J. F., Jr. (2002). "MMPs and TIMPs--an historical perspective." Mol Biotechnol **22**(1): 33-49.
- Wu, J., T. Akaike, et al. (2001). "Enhanced vascular permeability in solid tumor involving peroxynitrite and matrix metalloproteinases." Jpn J Cancer Res **92**(4): 439-51.
- Wu, N., E. D. Jansen, et al. (2003). "Comparison of mouse matrix metalloproteinase 13 expression in free-electron laser and scalpel incisions during wound healing." J Invest Dermatol **121**(4): 926-32.
- Yamasaki, K., H. D. Edington, et al. (1998). "Reversal of impaired wound repair in iNOS-deficient mice by topical adenoviral-mediated iNOS gene transfer." J Clin Invest **101**(5): 967-71.
- Yoon, Y. W., H. M. Kwon, et al. (2005). "Upstream regulation of matrix metalloproteinase by EMMPRIN; extracellular matrix metalloproteinase inducer in advanced atherosclerotic plaque." Atherosclerosis **180**(1): 37-44.
- Zaragoza, C., E. Lopez-Rivera, et al. (2006). "Cbfa-1 mediates nitric oxide regulation of MMP-13 in osteoblasts." J Cell Sci **119**(Pt 9): 1896-902.
- Zaragoza, C., E. Soria, et al. (2002). "Activation of the mitogen activated protein kinase extracellular signal-regulated kinase 1 and 2 by the nitric oxide-cGMP-cGMP-dependent protein kinase axis regulates the expression of matrix metalloproteinase 13 in vascular endothelial cells." Mol Pharmacol **62**(4): 927-35.
- Zhang, J., H. Ge, et al. (2007). "Inhibitory effect of PPAR on the expression of EMMPRIN in macrophages and foam cells." Int J Cardiol **117**(3): 373-80.
- Zhang, W., B. Razani, et al. (2000). "Caveolin-1 inhibits epidermal growth factor-stimulated lamellipod extension and cell migration in metastatic mammary adenocarcinoma cells (MTLn3). Transformation suppressor effects of adenovirus-mediated gene delivery of caveolin-1." J Biol Chem **275**(27): 20717-25.

- Zhang, Y. J., Y. F. Xu, et al. (2005). "Nitration and oligomerization of tau induced by peroxynitrite inhibit its microtubule-binding activity." FEBS Lett **579**(11): 2421-7.
- Zimmermann, K., N. Opitz, et al. (2002). "NOSTRIN: a protein modulating nitric oxide release and subcellular distribution of endothelial nitric oxide synthase." Proc Natl Acad Sci U S A **99**(26): 17167-72.

ANEXO I: PUBLICACIONES

Los papers que se derivan del trabajo de la presente Tesis Doctoral están enviados a publicar:

1- “Nitric oxide elicits functional MMP-13 protein-tyrosine nitration during wound repair.” Tania R. Lizarbe¹, Concepción García-Rama¹, Carlos Tarín¹, Marta Saura², Enrique Calvo¹, Juan Antonio López¹, Carlos López-Otín³, Alicia R. Folgueras³, Santiago Lamas⁴, Carlos Zaragoza^{1*}

2- “Downregulation of inducible nitric oxide synthase inhibits CD147 expression and protects from abdominal aortic aneurysm development ”. Tania R. Lizarbe¹, Carlos Tarín¹, Concepción García-Rama¹, Pilar Pallarés¹, Elena Marín², Enrique Aracil², Luis M. Orte³, Carlos Zaragoza^{1*}

Matrix metalloproteinase 13 mediates nitric oxide activation of endothelial cell migration

Esther López-Rivera^{*†}, Tania R. Lizarbe^{*†}, Mónica Martínez-Moreno[‡], José Miguel López-Novoa[§], Alicia Rodríguez-Barbero[§], José Rodrigo[¶], Ana Patricia Fernández[¶], Alberto Álvarez-Barrientos^{*}, Santiago Lamas^{*†||}, and Carlos Zaragoza^{*†||}

^{*}Fundación Centro Nacional de Investigaciones Cardiovasculares, Ronda de Poniente 5 Tres Cantos, 28760 Madrid, Spain; [§]Departamento de Fisiología y Farmacología, Instituto "Reina Sofía" de Investigación Nefrológica, Universidad de Salamanca, Avenida Campo Charro, 37007 Salamanca, Spain; [¶]Instituto Ramón y Cajal, Consejo Superior de Investigaciones Científicas, Avenida Del Dr. Arce 37, 28002 Madrid, Spain; [‡]Centro de Investigaciones Biológicas, Instituto "Reina Sofía" de Investigaciones Nefrológicas, Consejo Superior de Investigaciones Científicas, Ramiro de Maeztu 9, 28040 Madrid, Spain; and ^{||}Departamento de Bioquímica y Biología Molecular, Facultad de Química, Universidad Complutense de Madrid, 28040 Madrid, Spain

Edited by Louis J. Ignarro, University of California School of Medicine, Los Angeles, CA, and approved January 7, 2005 (received for review November 4, 2004)

To explore the mechanisms by which NO elicits endothelial cell (EC) migration we used murine and bovine aortic ECs in an *in vitro* wound-healing model. We found that exogenous or endogenous NO stimulated EC migration. Moreover, migration was significantly delayed in ECs derived from endothelial NO synthase-deficient mice compared with WT murine aortic EC. To assess the contribution of matrix metalloproteinase (MMP)-13 to NO-mediated EC migration, we used RNA interference to silence MMP-13 expression in ECs. Migration was delayed in cells in which MMP-13 was silenced. In untreated cells MMP-13 was localized to caveolae, forming a complex with caveolin-1. Stimulation with NO disrupted this complex and significantly increased extracellular MMP-13 abundance, leading to collagen breakdown. Our findings show that MMP-13 is an important effector of NO-activated endothelial migration.

angiogenesis | endothelium | vascular remodeling

Wound healing is an orchestrated cascade of enzymatic activities that converge toward damage repair. Wound healing involves inflammation and angiogenesis and is tightly regulated by cytokines (1). Vascular endothelial growth factor (VEGF) is a critical cytokine involved in angiogenesis, and nitric oxide (NO) is a downstream effector (2, 3). VEGF increases NO levels in endothelial cells (ECs) by activating endothelial NO synthase (eNOS/NOS3) (4–7). Recently, the role of eNOS in EC migration has been demonstrated *in vivo* and *in vitro* (8, 9) but the precise mechanism by which NO regulates migration is unknown.

ECs migrate as a result of an injury and during angiogenesis from preexisting vessels. The process is tightly regulated by matrix turnover, in which matrix metalloproteinases (MMPs) play a pivotal role (10–12). We have previously reported that NO induces MMP-13 expression and activity in bovine aortic ECs (BAECs) (13, 14).

MMPs are extracellular matrix-degrading endopeptidases. MMP expression and activity can be found in physiological and pathological situations, such as tissue development, atherosclerosis, ovarian function, arthritis, osteoarthritis, cancer, angiogenesis, and wound healing (15). MMP-13 was initially discovered in mammalian cell carcinomas and is also expressed by several cell types, including endothelium (13, 16–18).

Here, we present evidence that MMP-13 is a downstream effector of NO-activated EC movement. We have developed a wound-healing model in BAECs and aortic cells from eNOS WT and eNOS-deficient mice. We show that aortic ECs lacking MMP-13 experience delayed migration, and aortic ECs from eNOS null mice present delayed cell migration and a significant decrease in MMP-13 expression. In addition, we present data showing that MMP-13 exists in association with caveolin-1 in resting cells, and that this complex is disrupted in the presence

of NO, leading to the secretion of MMP-13 to the extracellular media. We postulate that NO induces EC movement in part via the disruption of the MMP-13/caveolin-1 complex, which in turn releases the secretion of active MMP-13 to the extracellular matrix.

Methods

Reagents. Cell culture supplies, GFR Matrigel solution, and the BD cell recovery solution (MatriSpere) were from Becton Dickinson. Cell culture transwells were from Costar, calf serum was from BioWhittaker, and cell culture gelatin and antibiotics were from Sigma. Collagen type I was from ICN. Autoradiography film was from Kodak. Poly(vinylidene difluoride) protein transfer membranes were from Millipore, and horseradish peroxidase-conjugated secondary antibodies, ECL-detecting immunoblot system, and protein A-Sepharose were from Amersham Pharmacia. EDTA-free protease inhibitor mixture tablets were from Roche Molecular Biochemicals. OptiMEM and Lipofectamine were from GIBCO/BRL. MMP-13 polyclonal antibodies and Fluorsave coverslip mounting solution were from Calbiochem. MMP-13 mAbs were from Chemicon. Anti-MT1-MMP was from Oncogene Science. Anti-caveolin-1 was from Becton Dickinson. The Silencer small interfering RNA (siRNA) construction kit was from Ambion (Cambridgeshire, U.K.).

Animals. WT C57BL/6 mice and (C57BL/6,129) eNOS null mice were purchased from The Jackson Laboratory and housed in our own animal facilities in isolated rooms.

Cells. BAECs were incubated in gelatin or collagen type I as described (14).

Murine aortic ECs (MAECs) were cultured from aortas extracted from anesthetized animals after death. The aortas were sectioned into 2-mm pieces, deposited in Matrigel solution, and fed with fresh growth medium for 7 days [DMEM/HAM's medium (19), 20% FBS, 0.05 mg/ml penicillin/streptomycin, and 2.5 μ g/ml amphotericin]. The tissue was removed, and 500 μ l of BD Cell recovery solution was added to each culture. The Matrigel layer was removed and poured on ice for 1 h. The solution was centrifuged at 4°C, resuspended in 4 ml of growing medium, and plated.

MAECs were selected by their ability to express the intercellular adhesion molecule-2 (ICAM-2) protein and purified with

This paper was submitted directly (Track II) to the PNAS office.

Abbreviations: EC, endothelial cell; MAEC, murine aortic EC; BAEC, bovine aortic EC; eNOS, endothelial NO synthase; ICAM-2, intercellular adhesion molecule-2; DEA-NO, 2-(*N,N*-diethylamino)-diazene-2-oxide diethylammonium salt; MMP, matrix metalloproteinase; siRNA, small interfering RNA; L-NAME, L-nitroarginine methyl ester.

^{||}To whom correspondence may be addressed. E-mail: slamas@cnic.es or czaragoza@cnic.es.

© 2005 by The National Academy of Sciences of the USA

a flow cytometry cell sorter (DAKO). Purification was verified by confocal microscopy of MAECs double-stained with von Willebrand factor antibodies.

Wound-Healing Assay. BAECs or MAECs were grown in six-well plates, and a straight incision was made on the monolayer. Cell movement was monitored over a time course by microscopy and calculated by determining the area unoccupied by cells at every time point, allowing us to establish the rate of cell movement between individual time points [IMAGE software for Macintosh, by Wayne Rasband (20), National Institutes of Health, Bethesda].

Immunoblot Analysis. Cell lysate extraction and protein immunoblots were performed as described (13).

Immunoprecipitation. Cells were disrupted with RIPA buffer (1 × PBS/1% Nonidet P-40/0.5% sodium deoxycholate/0.1% SDS), low-salt lysis buffer, or octyl-glucoside buffer and precleared with the appropriate control IgG with protein A-Sepharose. Precleared supernatants were incubated for 16 h with the corresponding antibodies with protein A-Sepharose and washed four times with cold PBS. Samples were boiled and analyzed by SDS/PAGE.

Preparation of Caveolin-Enriched Low-Density Membrane Fractions. BAECs were grown in T150 flasks and resuspended in 2 ml of Mes-buffered saline (25 mM Mes, pH 6.5/0.15 M NaCl/EDTA-free protease inhibitor mixture tablet/0.5% Triton X-100). Cells were homogenized by passing through a 0.45 × 16-mm syringe at 4°C. The homogenate was adjusted with 2 ml of 80% sucrose in Mes-buffered saline. The solution was separated by ultracentrifugation in a discontinuous sucrose gradient (40%–30%–5%) in a SW40 rotor (Beckman) at 200,000 × g for 18 h. After centrifugation, 1-ml fractions were collected, starting at the upper part of the centrifuge tube. To each fraction, 1 ml of cold acetone was added and the mixture was precipitated overnight at 4°C. Samples were centrifuged, pellets were dried, and 100 μl of RIPA buffer was added to each sample.

Confocal Microscopy. BAECs were grown on cover slides, and after treatment, washed twice with PBS. Cells were fixed and permeabilized or not with cold methanol and incubated with 3% BSA in PBS for 1 h. Covers were incubated with primary antibodies for 1 h, washed four times with PBS, incubated with fluorescence-conjugated secondary antibodies, and visualized by confocal microscopy (Radiance 2100, Bio-Rad). The fluorescence-conjugated secondary antibodies Alexa J43 (excitation wavelength, 543 nm; emission wave length, 586–590 nm), swine anti-goat-FITC (excitation wavelength, 488 nm; emission wave length, 515 nm), and rabbit anti-mouse-FITC were used. Nuclei were stained with Hoechst (excitation wave length, 405 nm; emission wave length, 424 nm).

Immunohistochemistry. Aortas from 6-week-old mice were harvested, and aortic rings were perfused with 0.9% NaCl and fixed with 4% paraformaldehyde in 0.1 M phosphate buffer, pH 7.4. Tissues were frozen, and serial sections were cut with a sledge cryostat (CM1900, Leica, Deerfield, IL). Free-floating sections were washed in PBS and incubated in PBS containing 3% hydrogen peroxide for 30 min to quench the endogenous peroxidase. Sections were incubated in 0.2% Triton X-100 and 3% normal serum for 1 h and then incubated with an anti-MMP-13. After washing with PBS, sections were incubated with a biotinylated secondary antibody (Vector Laboratories), and then with peroxidase-linked ABC (Vector Laboratories). Peroxidase activity was shown by nickel enhancement 3,3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride.

Gene Silencing. MMP-13 expression was silenced in BAECs with the Silencer siRNA construction kit from Ambion, according to the manufacturer's guidelines. In brief, we synthesized sets of two self-complementary 29-oligonucleotide templates, in which the first eight nucleotides at the 3' end contain the T7 primer domain at which the T7 RNA polymerase uses the leader sequence 5'-CCTGTCTC-3'. The remaining 21 nucleotides were homologous with specific regions of the bovine MMP-13 mRNA. Sequences were subject to BLAST, and finally the following set of oligonucleotides were selected: MMP-13 sense 5'-AAAG-GAAGCATAAAGTGGCTTCCTGTCTC-3'; MMP-13 antisense 5'-AAAAGCCACTTTATGCTTCCTCCTGTCTC-3. Expression of MMP-13 in BAECs was silenced by transfecting the dsRNA with the Lipofectamine method (Invitrogen) as described (13). We transfected cells with different concentrations of dsRNA, and MMP-13 was monitored 16 and 72 h after transfection.

Metalloproteinase Activity. MMP-13, MMP-1, MMP-2, MMP-3, MMP-7, and MMP-9 activities were measured by using a fluorescent substrate from Chemicon as described (13).

Statistical Analysis. Unless otherwise specified, data are expressed as means ± SD, and experiments were performed at least three times in duplicate. Comparisons were made with ANOVA followed by Dunnett's modification of the *t* test, whenever comparisons were made with a common control or by nonparametric tests as appropriate. Error bars represent ± SD.

MMP-13 and Caveolin-1 Expression. Full-length MMP-13 cDNA was cloned into pQE30 expression vector (Qiagen, Valencia, Ca) fused to a 6XHis tail at the end terminus (pHis-MMP-13). Expression was induced in *Escherichia coli* cultures with 1 mM isopropyl β-D-thiogalactoside for 3 h at 37°C. Recombinant MMP-13 was purified by Ni²⁺-affinity chromatography (HisTrap kit, Amersham Pharmacia), according to the manufacturer's instructions, and monitored by immunoblot with anti-6XHis (Sigma) and anti-MMP-13 (Chemicon) antibodies.

Recombinant caveolin-1 was inserted into the pGEX2 vector (Amersham Pharmacia). GST-caveolin-1 was used to routinely transform BL21 DE3 competent cells (Novagen), and the recombinant protein was purified by using a glutathione agarose resin (Amersham Pharmacia) following the manufacturer's instructions.

Results

NO Induces EC Migration. We performed wound-healing assays in BAECs (Fig. 1A) and MAECs (Fig. 1B) incubated with the NO donor 2-(*N,N*-diethylamino)-diazene-2-oxide diethylammonium salt (DEA-NO) (100 μM), and endogenous NO production was stimulated by the incubation with bradykinin (10⁻⁶ M). NO stimulated the migration of the endothelium during the first 2 h of incubation when compared with wounded but nonchallenged cell cultures. The specific role of NO was evaluated by incubating with the NO synthase inhibitor L-nitroarginine methyl ester (L-NAME) (500 μM). In cells stimulated with bradykinin plus L-NAME the contribution of NO was significantly reduced (Fig. 1A and B Upper). The same experiments were performed by plating BAECs on collagen type I, with similar results (data not shown).

ECs were also tested for their capacity to migrate in transwell plates (see *Methods* for details). In cells treated either with DEA-NO (100 μM) or bradykinin (10⁻⁶ M) transmigration was significantly increased with respect to control cells and bradykinin-stimulated cells treated with L-NAME (500 μM) (Fig. 1C).

To exclude a proliferative effect of NO, ECs were treated with the same stimuli as above, and then counted at regular intervals. No significant differences in cell number were shown (Fig. 1D).

Among the different enzymes, MMPs play a pivotal role in cell

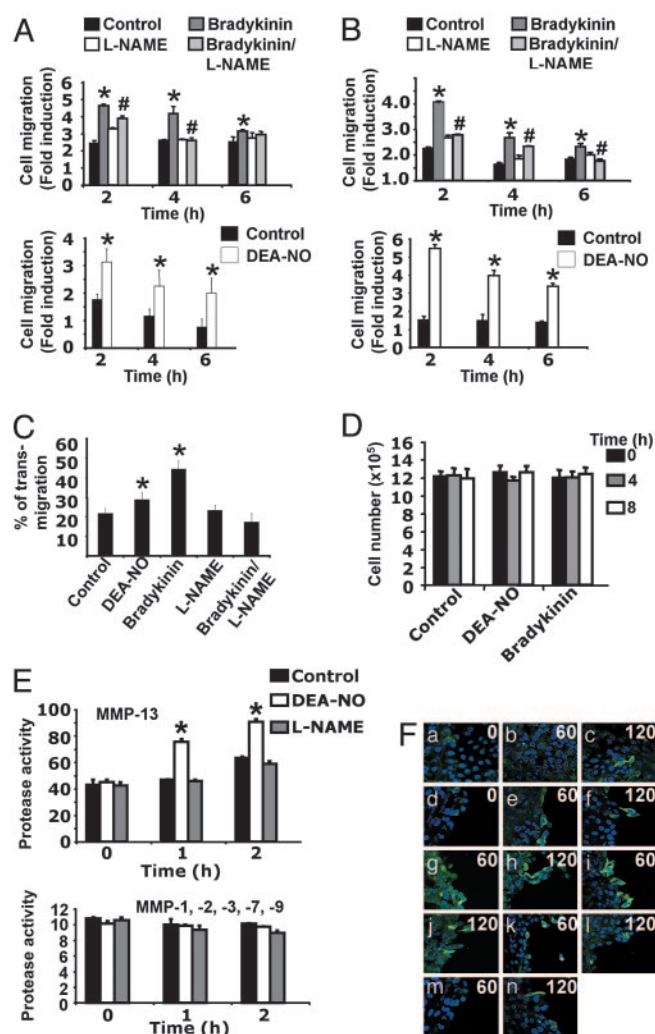


Fig. 1. NO induces EC movement in a wound-healing model. (A and B) BAEC (A) or MAEC (B) monolayers were injured and treated with 10^{-6} M bradykinin, 500 μ M L-NAME, bradykinin/L-NAME, or 100 μ M DEA-NO, and cell movement was monitored by microscopy ($n = 3$ by triplicate; mean \pm SD; *, $P < 0.05$ vs. control; #, $P < 0.05$ vs. bradykinin). (C) BAEC monolayers were seeded on 8- μ m porous transwell filters and treated with 100 μ M DEA-NO, 10^{-6} M bradykinin, 0.5 mM L-NAME, or the combination bradykinin/L-NAME. After 6 h of plating, transmigration was evaluated by confocal microscopy (see Methods for details, $n = 2$ by triplicate; *, $P < 0.05$ vs. control). (D) ECs were injured and treated with 100 μ M DEA-NO or 10^{-6} M bradykinin. Total cell number was evaluated at the indicated times ($n = 3$ by triplicate; mean \pm SD). (E) EC monolayers were treated with 100 μ M DEA-NO or 500 μ M L-NAME. MMP activities were measured by fluorimetry from culture supernatants collected at regular time points ($n = 3$ by quadruplicate; mean \pm SD; *, $P < 0.05$ vs. control). (F) EC monolayers (a–c) were injured (d–n, see Methods for details) and treated with 100 μ M DEA-NO (b, c, g, and h), 100 μ M DEA (m and n), 10^{-6} M bradykinin (i and j), or 10^{-6} M bradykinin/500 μ M L-NAME (k and l). MMP-13 was visualized over time (0, 1, and 2 h as indicated) with immunohistochemical staining (MMP-13, FITC, green; nuclei Hoechst, blue) by confocal microscopy (magnification: $\times 40$, $n = 3$).

migration, and we found that in supernatants collected during the first 2 h of treatment, MMP-13 activity was induced in response to NO, whereas no significant differences were detected for MMP-1, MMP-2, MMP-3, MMP-7, and MMP-9 (Fig. 1E). In view of this result, we decided to examine the distribution of MMP-13 by confocal microscopy during a time course of wound healing. We found that when aortic ECs were stimulated with DEA-NO or bradykinin migration was faster and MMP-13

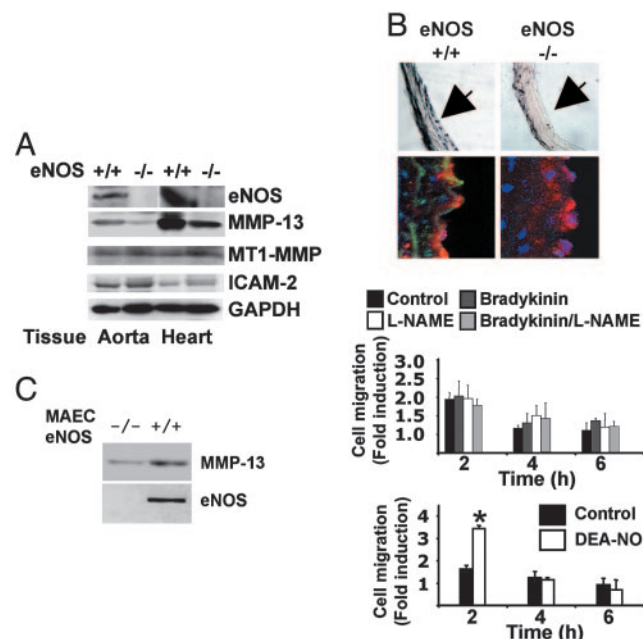


Fig. 2. ECs from eNOS-deficient mice migrate slower and show lower MMP-13 levels when compared with their eNOS WT counterparts. (A) Aortas and hearts from a pool of eNOS-deficient mice and eNOS WT mice were homogenized and used to evaluate eNOS, MMP-13, MT1-MMP, ICAM-2, and GAPDH expression ($n = 3$ animals by triplicate). (B) Aortic rings were isolated from eNOS-deficient mice and eNOS WT mice, and MMP-13 was visualized by immunohistochemistry and immunohistochemistry using an anti-MMP-13 antibody. MMP-13 was visualized by peroxidase staining (Upper, magnification $\times 20$) and FITC (Lower, magnification $\times 60$). Aortic nuclei were stained with Hoechst. ICAM-2 expression was visualized in red ($n = 5$). (C) MAECs from eNOS WT or eNOS-deficient mice were isolated, and lysates were immunoblotted to detect the expression of MMP-13 and eNOS (Left). In addition, a wound-healing assay was performed in cells treated with 100 μ M DEA-NO, 10^{-6} M bradykinin, 500 μ M L-NAME, and bradykinin/L-NAME ($n = 3$ by triplicate; mean \pm SD; *, $P < 0.01$ vs. control).

was accumulated at the wound edge, when compared with DEA (without the NO moiety) stimulation (Fig. 1F g and h vs. m and n). The effect partially depended on NO, because L-NAME caused a delay in the cell migration and MMP-13 accumulation (Fig. 1F i and j vs. k and l). These results suggest MMP-13 acts as a downstream effector in the NO-mediated EC migration.

NO Synthase Null Mouse ECs Migrate Slower Than NO Synthase WT ECs in a Wound-Healing Model. To elucidate whether MMP-13 may serve as an NO-effector molecule during cell migration, we found that MMP-13 expression was reduced in eNOS-null mouse hearts and aortas, as detected by immunoblot (Fig. 2A). Immunohistochemical analysis of aortic rings from eNOS-deficient mice also revealed a decreased MMP-13 expression in the endothelial layer (Fig. 2B Upper), whereas the levels of the endothelial marker ICAM-2 remained the same (Fig. 2B Lower). In addition, during wound-healing assays in MAECs from eNOS-deficient mice, we found that a single addition of NO was not as effective as in MAECs from eNOS WT mice (Fig. 2C vs. Fig. 1B). Moreover, no differences were observed in cell migration in response to bradykinin, consistent with the lack of eNOS in these cells (Fig. 2C Upper), as compared with their WT counterparts (Fig. 1B), in which the bradykinin effect depended on NO, because L-NAME inhibited the stimulatory effect on cell migration (Fig. 1B). Thus, lack of eNOS inhibits MMP-13 expression and NO-mediated cell migration.

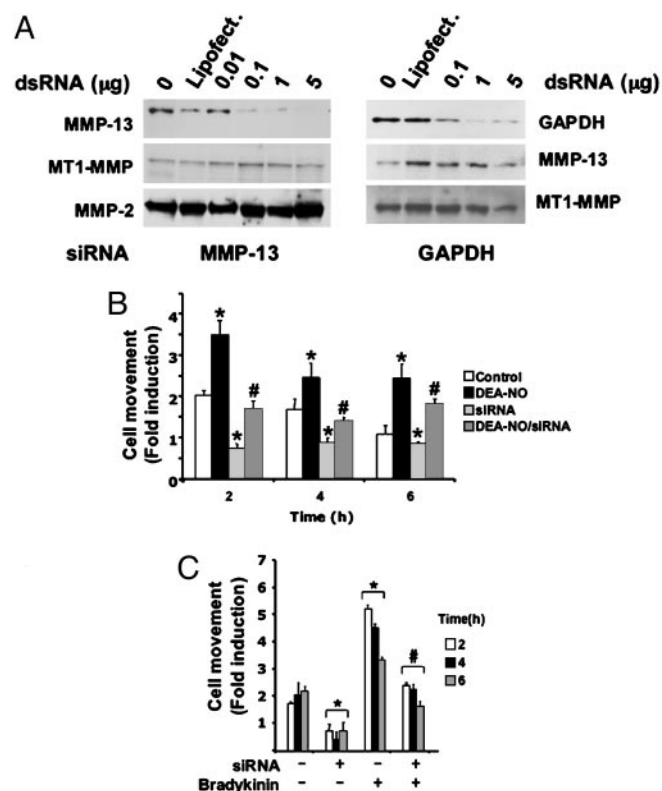


Fig. 3. EC migration depends on MMP-13 expression. (A) Immunoblot detection of MMP-13, MT1-MMP, and MMP-2 (Left) and GAPDH, MMP-13, and MT1-MMP (Right) in MMP-13 (Left) and GAPDH (Right) silenced cells. Shown is one representative experiment from a total of three. (B) ECs were injured and treated with 100 μ M DEA-NO ($n = 3$ by quadruplicate; mean \pm SD; *, $P < 0.05$ vs. control; #, $P < 0.05$ vs. DEA-NO). (C) ECs were subject or not to MMP-13 silencing, injured, and treated with 10^{-6} M bradykinin ($n = 3$ by triplicate; mean \pm SD; *, $P < 0.05$ vs. nonstimulated/nonsilenced; #, $P < 0.05$ vs. stimulated with bradykinin/nonsilenced).

MMP-13 Is an Active Component of NO-Mediated EC Migration. To test the contribution of NO during migration of cells in which MMP-13 is down-regulated, we performed a wound-healing assay in BAECs in which MMP-13 was silenced by RNA interference. We collected protein lysates from BAECs transiently transfected with different amounts of MMP-13 dsRNAs, tracked MMP-13 expression by immunoblot, and selected the optimum RNA dose (0.1 μ g, 50 nM, Fig. 3A Left). As a control, the expression of MT1-MMP and MMP-2 was evaluated (Fig. 3A Left) and GAPDH expression was silenced, monitoring the expression of MMP-13 and MT1-MMP (Fig. 3A Right). Cells in which MMP-13 was reduced migrated slower than did control cells, DEA-NO-stimulated cells (Fig. 3B), and bradykinin-stimulated ECs (Fig. 3C). Neither DEA-NO nor bradykinin was able to counteract the inhibited cell migration in MMP-13-silenced cells. These results demonstrate the contribution of MMP-13 as an effector of NO-dependent cell migration.

MMP-13 Is Associated with Caveolin-1 in EC Membranes. To explore the mechanism exerted by NO on MMP-13-mediated cell migration, we first investigated the location of MMP-13 in aortic ECs. We found by confocal microscopy that in nonpermeabilized cells MMP-13 is clustered in the membrane of BAECs, whereas in permeabilized BAECs a small portion of MMP-13 is also detected inside the cells (Fig. 4A) and colocalizes with caveolin-1 (Fig. 4B). By isolating caveolin-1-enriched fractions (see Methods for details) we found that MMP-13 was present both in

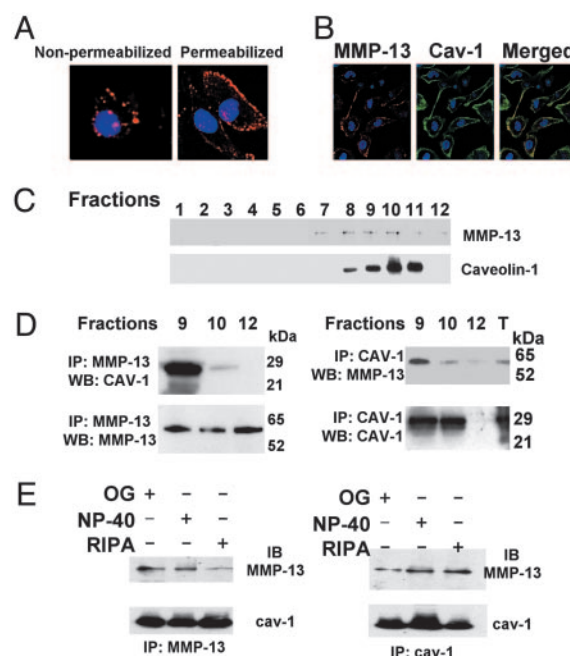


Fig. 4. MMP-13 colocalizes with caveolin-1 in endothelial plasma membranes. (A) Confocal microscopy analysis of BAECs showing the expression of MMP-13 in nonpermeabilized and permeabilized BAECs. (B) Confocal microscopy analysis showing the expression of caveolin-1 (green) and MMP-13 (red) in BAECs. Merged panel shows colocalization of MMP-13 and caveolin-1 (yellow) ($n = 5$). (C) Caveolae-enriched fractions were isolated and identified by immunoblot with anti-caveolin-1. MMP-13 was also evaluated in the same fractions ($n = 3$). (D) Caveolin-1-positive (fractions 9 and 10) and -negative (fraction 12) fractions from ECs were subjected to cross-coimmunoprecipitation with anti-MMP-13 (Left) and anti-caveolin-1 (Right). Caveolin-1 or MMP-13 were detected by immunoblot ($n = 4$). (E) Cell lysates were subjected to cross-coimmunoprecipitation as indicated, in octyl-glucoside (OG), Nonidet P-40, and RIPA buffers ($n = 3$).

caveolin-1-positive and -negative fractions (Fig. 4C). Crossed coimmunoprecipitation experiments revealed that MMP-13 is complexed with caveolin-1 in caveolar-enriched fractions (Fig. 4C, fractions 9 and 10), as well as in total cell extracts, whereas it does not form a complex in the noncaveolar fraction 12 (Fig. 4D). To exclude the possibility of lipid-mediated interaction, we performed immunoprecipitation assays incubated with a buffer containing octyl-glucoside, a detergent that removes any trace of protein-lipid interaction, and the caveolin-1-MMP-13 complex was not disrupted, confirming that no lipid association is involved in the complex (Fig. 4E).

NO Promotes the Dissociation of MMP-13 from Caveolin-1 and Induces the Release of MMP-13 into the Extracellular Matrix. The fact that NO induces the release and activity of MMP-13 to the extracellular matrix was addressed by immunoblotting MMP-13, collected from cultured media in cells treated either with DEA-NO or bradykinin, as detected by Western blot (Fig. 5A), as well as the collagenolytic activity measured in media collected under these conditions (Fig. 5B).

To explore whether NO disrupted the association with caveolin-1, EC extracts were enriched in MMP-13 by immunoprecipitation. In NO-treated ECs, the association of caveolin-1-MMP-13 was significantly reduced (Fig. 5C). To further confirm this effect, we expressed and purified recombinant MMP-13 fused to a 6XHis tag at the N terminus (Fig. 5D). Recombinant MMP-13 was incubated with cell lysates from BAECs treated with vehicle or 100 μ M DEA-NO, in which caveolin-1 or 6XHis proteins were immunoprecipitated (Fig.

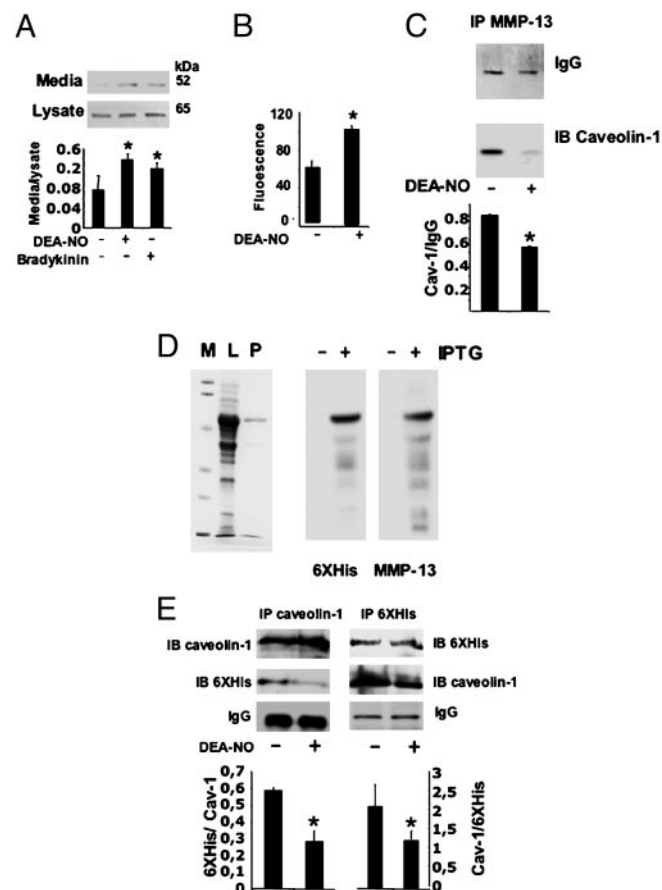


Fig. 5. NO disrupts the MMP-13/caveolin-1 complex in BAEC. (A) Immunoblot of MMP-13 from cell lysates or culture media collected after 2 h of treatment of ECs with 100 μ M DEA-NO or 10^{-6} M bradykinin. The graph represents the densitometric analysis of data from three independent experiments (mean \pm SD; *, $P < 0.05$). (B) MMP-13 activity assay in cell media from ECs treated for 2 h with 100 μ M DEA-NO ($n = 3$; mean \pm SD; $P < 0.05$). (C) Immunoprecipitation of MMP-13 from caveolin-1-enriched fractions of vehicle and ECs treated with 100 μ M DEA-NO. Caveolin-1 was detected by immunoblot ($n = 4$ by triplicate; mean \pm SD; *, $P < 0.01$). (D) MMP-13 was expressed in *E. coli* and purified by affinity chromatography. IP, immunoprecipitation; WB, Western blot. (Left) Coomassie staining of a 12% SDS/PAGE. M, molecular weight marker; L, bacterial lysate from cells treated with 1 mM isopropyl β -D-thiogalactoside (IPTG); P, purified MMP-13. (Right) Immunoblots from purified MMP-13, with anti-6XHis and anti-MMP-13 antibodies. (E) Crossed-coimmunoprecipitation experiments from purified MMP-13 incubated with cell lysates of BAECs for 16 h at 4°C and treated with DEA-NO or vehicle for 2 h ($n = 3$; mean \pm SD; *, $P < 0.05$).

5E). A 60-kDa 6XHis protein was decreased in extracts treated with DEA-NO in caveolin-1-enriched extracts (Fig. 5E Left). In a similar fashion in 6XHis-enriched cell extracts we found similar levels of MMP-13 in vehicle and NO-treated cells, whereas caveolin-1 was increased in those extracts treated with vehicle (Fig. 5E Right) compared with those treated with NO. In addition, we demonstrated this effect by expressing recombinant caveolin-1 fused to a GST tag (Fig. 6A). The incubation of *E. coli*-expressed recombinant 6XHis-MMP-13 and GST-caveolin-1 proteins in the absence and presence of DEA-NO showed the same effect. The complex detected by immunoprecipitation with the corresponding anti-MMP-13 or anti-caveolin-1 antibodies was reduced in the presence of DEA-NO (Fig. 6A). To elucidate whether exposure of NO affects the interaction by targeting MMP-13 and/or caveolin-1 we first preincubated 6XHis-MMP-13 or GST-caveolin-1 with 100 μ M

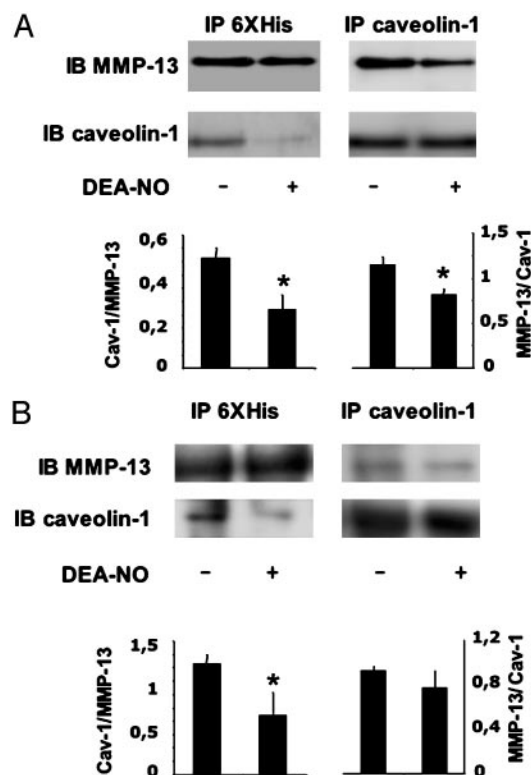


Fig. 6. NO disrupts the *in vitro* MMP-13/caveolin-1 complex. (A) Recombinant 6XHis-MMP-13 and GST-caveolin-1 were purified and subject to immunoprecipitation (IP) experiments in the presence or absence of 100 μ M DEA-NO to visualize the binding to caveolin-1 and MMP-13, respectively ($n = 3$; mean \pm SD; *, $P < 0.05$). IB, immunoblot. (B) Recombinant 6XHis-MMP-13 or GST-caveolin-1 were pretreated with 100 μ M DEA-NO for 1 h, bound to GST-caveolin or 6XHis-MMP-13, respectively (nontreated with DEA-NO), and subjected to immunoprecipitation (IP) experiments ($n = 3$; mean \pm SD; *, $P < 0.05$). IB, immunoblot.

DEA-NO, and after incubation with the corresponding DEA-NO-untreated protein (GST-caveolin-1 or 6XHis-MMP-13, respectively) the same immunoprecipitation analysis was performed as before (Fig. 6*B*). Whereas DEA-NO-treated GST-caveolin-1 did not affect the binding to 6XHis-MMP-13, when 6XHis-MMP-13 was preincubated with DEA-NO, a significant reduction in the binding to GST-caveolin-1 was detected. These data support the notion that NO targets MMP-13 and disrupts it from the complex with caveolin-1.

Discussion

Our data demonstrate the importance of MMP-13 in EC migration activated by NO. MMP-13 is located at the plasma membrane of the injured EC monolayers, but NO stimulates MMP-13 release and EC migration.

Previous reports have described the contribution of MMP-13 to wound repair in several tissues, including bone, cornea, and joint tissue (21, 22). However, the significance of MMP-13 in EC migration was still unknown. The finding that NO promotes MMP-13 expression in BAECs (13) encouraged us to investigate its possible role in vascular ECs. We evaluated the importance of MMP-13 in EC migration by silencing its expression. We have demonstrated that MMP-13 is essential for ECs to migrate across the plate and that the promigratory effect of NO partially depends on MMP-13.

Other investigators have shown that NO is part of the downstream signaling cascade mediated by vascular endothelial growth factor during EC migration (4–8, 23–26), and the

NO-mediated cGMP signaling pathway has recently been implicated in this process (27). However, to our knowledge the precise interplay with the extracellular matrix has not been studied before. Our experiments identify a pathway involving the extracellular matrix by which NO regulates migration. Immunohistochemical analysis of MMP-13 in aortic rings from eNOS WT mice and eNOS-deficient mice shows a reduction in MMP-13 levels when eNOS is absent, a result that is consistent with our previous findings in BAEC (13). By isolating ECs from eNOS-deficient mice we have been able to show that EC migration and MMP-13 expression are both inhibited as compared with WT mouse ECs. Furthermore, exogenous addition of NO to eNOS-null mouse ECs restored the behavior exhibited by their counterpart WT cells at early time points. These data led us to propose that MMP-13 is an important downstream effector of NO during EC migration.

The fact that other metalloproteinases are located within the caveolar region (28, 29) prompted us to investigate whether MMP-13 could also be located there. The association of caveolin-1 in complexes with other proteins frequently is linked to enzymatic inhibition, as occurs with eNOS. Even when eNOS and MMP-13 are sharing caveolin-1 as a partner in the membrane, we found that MMP-13 and eNOS do not interact directly in ECs (data not shown). Our data are consistent with a model in which NO disrupts the interaction of MMP-13 and caveolin-1, promoting its secretion (Fig. 5). This effect results in increased EC migration, and eventually in ECM degradation and angiogenesis. However, other pathophysiological processes may also be targets for this molecular interplay. NO has been considered as a double-edged sword. NO production is beneficial during several processes, including cell migration (30–32), but also may have other deleterious consequences, especially when produced

at high concentrations, as has been reported in aneurysm rupture and atherosclerosis (33, 34). NO generated at micromolar amounts arising from macrophages or smooth muscle cells, provoking extensive MMP-13 secretion, may contribute to the tissue remodeling associated with these conditions.

The effect of NO in dissociating caveolin-1 scaffold has been reported (35). Based on previous results from our laboratory (14) and studies of the roles of reactive oxygen species and reactive nitrogen intermediate in the activation of other MMPs (36–38), perhaps NO could directly activate MMP-13 by promoting its catalytic activation by cleavage of the pro-peptide. Activation by S-nitrosylation of the cysteine switch by NO and/or related species is a plausible alternative and has been recently reported for MMP-9 (39).

The results we have presented here provide evidence for a central role for MMP-13 in the migration of ECs and the contribution of NO to the activation of this metalloproteinase. This study may help to increase understanding of the pluripotent roles of NO in vascular physiology and pathophysiology.

We thank Drs. Juan Miguel Redondo, Alicia García-Arroyo, and Carlos López-Otín for helpful discussion and suggestions during the elaboration of the present manuscript and Elvira Arza for valuable assistance with confocal microscopy and MAEC cultures. This work was supported by Plan Nacional de I+D+I Salud y Farmacia Grant 2002-00399, Ministerio de Ciencia y Tecnología “Programa Ramón y Cajal,” Comunidad Autónoma de Madrid Grant 08.4/0023/2003 1 (to C.Z.), European Union Fondo Europeo de Desarrollo Regional Grant 2FD97-1432 and Plan Nacional de I+D+I Salud y Farmacia Grant 2000-0149 and Salud y Farmacia Grant 2003-01039 (to S.L.), and a grant-in-aid from the Spanish Society of Nephrology 2001 and Red Temática Cooperativa de Enfermedades Cardiovasculares C03/01 from the Ministerio de Sanidad y Consumo (to C.Z. and S.L.).

- Schwentker, A., Vodovotz, Y., Weller, R. & Billiar, T. R. (2002) *Nitric Oxide* **7**, 1–10.
- Papapetropoulos, A., Garcia-Cardena, G., Madri, J. A. & Sessa, W. C. (1997) *J. Clin. Invest.* **100**, 3131–3139.
- Ziche, M., Morbidelli, L., Choudhuri, R., Zhang, H. T., Donnini, S., Granger, H. J. & Bicknell, R. (1997) *J. Clin. Invest.* **99**, 2625–2634.
- Dimmeler, S., Dernbach, E. & Zeiher, A. M. (2000) *FEBS Lett.* **477**, 258–262.
- Noiri, E., Lee, E., Testa, J., Quigley, J., Colflesh, D., Keese, C. R., Giaever, I. & Goligorsky, M. S. (1998) *Am. J. Physiol.* **274**, C236–C244.
- Urbich, C., Reissner, A., Chavakis, E., Dernbach, E., Haendeler, J., Fleming, I., Zeiher, A. M., Kaszkin, M. & Dimmeler, S. (2002) *FASEB J.* **16**, 706–708.
- Chavakis, E., Dernbach, E., Hermann, C., Mondorf, U. F., Zeiher, A. M. & Dimmeler, S. (2001) *Circulation* **103**, 2102–2107.
- Lee, P. C., Salyapongse, A. N., Bragdon, G. A., Shears, L. L., 2nd, Watkins, S. C., Edington, H. D. & Billiar, T. R. (1999) *Am. J. Physiol.* **277**, H1600–H1608.
- Murohara, T., Asahara, T., Silver, M., Bauters, C., Masuda, H., Kalka, C., Kearney, M., Chen, D., Symes, J. F., Fishman, M. C., *et al.* (1998) *J. Clin. Invest.* **101**, 2567–2578.
- Galvez, B. G., Matias-Roman, S., Albar, J. P., Sanchez-Madrid, F. & Arroyo, A. G. (2001) *J. Biol. Chem.* **276**, 37491–37500.
- Schaffer, M. R., Tantry, U., Thornton, F. J. & Barbul, A. (1999) *Eur. J. Surg.* **165**, 262–267.
- Shukla, A., Rasik, A. M. & Shankar, R. (1999) *Mol. Cell. Biochem.* **200**, 27–33.
- Zaragoza, C., Soria, E., Lopez, E., Browning, D., Balbin, M., Lopez-Otin, C. & Lamas, S. (2002) *Mol. Pharmacol.* **62**, 927–935.
- Zaragoza, C., Balbin, M., Lopez-Otin, C. & Lamas, S. (2002) *Kidney Int.* **61**, 804–808.
- Nagase, H. & Woessner, J. F., Jr. (1999) *J. Biol. Chem.* **274**, 21491–21494.
- Freije, J. M., Diez-Itza, I., Balbin, M., Sanchez, L. M., Blasco, R., Tolivia, J. & Lopez-Otin, C. (1994) *J. Biol. Chem.* **269**, 16766–16773.
- Stahle-Backdahl, M., Sandstedt, B., Bruce, K., Lindahl, A., Jimenez, M. G., Vega, J. A. & Lopez-Otin, C. (1997) *Lab. Invest.* **76**, 717–728.
- Balbin, M., Pendas, A. M., Uria, J. A., Jimenez, M. G., Freije, J. P. & Lopez-Otin, C. (1999) *Apmis* **107**, 45–53.
- Becher, H., Grau, A., Steindorf, K., Buggle, F. & Hacke, W. (2000) *J. Epidemiol. Biostat.* **5**, 277–283.
- Fagan, S. C., Payne, L. W. & Houtekier, S. C. (1989) *DICP Ann. Pharmacother.* **23**, 957–962.
- Yamagiwa, H., Tokunaga, K., Hayami, T., Hatano, H., Uchida, M., Endo, N. & Takahashi, H. E. (1999) *Bone* **25**, 197–203.
- Ye, H. Q., Maeda, M., Yu, F. S. & Azar, D. T. (2000) *Invest. Ophthalmol. Visual Sci.* **41**, 2894–2899.
- Hamuro, M., Polan, J., Natarajan, M. & Mohan, S. (2002) *Atherosclerosis* **162**, 277–287.
- Goligorsky, M. S., Budzikowski, A. S., Tsukahara, H. & Noiri, E. (1999) *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* **26**, 269–271.
- Noiri, E., Hu, Y., Bahou, W. F., Keese, C. R., Giaever, I. & Goligorsky, M. S. (1997) *J. Biol. Chem.* **272**, 1747–1752.
- Pearson, J. D. (2000) *Lupus* **9**, 183–188.
- Kawasaki, K., Smith, R. S., Jr., Hsieh, C. M., Sun, J., Chao, J. & Liao, J. K. (2003) *Mol. Cell. Biol.* **23**, 5726–5737.
- Annabi, B., Lachambre, M., Bousquet-Gagnon, N., Page, M., Gingras, D. & Beliveau, R. (2001) *Biochem. J.* **353**, 547–553.
- Puyraimond, A., Fridman, R., Lemesle, M., Arbeille, B. & Menashi, S. (2001) *Exp. Cell Res.* **262**, 28–36.
- Aicher, A., Heeschen, C., Mildner-Rihm, C., Urbich, C., Ihling, C., Technau-Ihling, K., Zeiher, A. M. & Dimmeler, S. (2003) *Nat. Med.* **9**, 1370–1376.
- Babaei, S. & Stewart, D. J. (2002) *Cardiovasc. Res.* **55**, 190–200.
- Poppa, V., Miyashiro, J. K., Corson, M. A. & Berk, B. C. (1998) *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **18**, 1312–1321.
- Napoli, C. & Ignarro, L. J. (2001) *Nitric Oxide* **5**, 88–97.
- Fukuda, S., Hashimoto, N., Naritomi, H., Nagata, I., Nozaki, K., Kondo, S., Kurino, M. & Kikuchi, H. (2000) *Circulation* **101**, 2532–2538.
- Li, H., Brodsky, S., Basco, M., Romanov, V., De Angelis, D. A. & Goligorsky, M. S. (2001) *Circ. Res.* **88**, 229–236.
- Wen, J., Brenneisen, P., Wlaschek, M., Poswig, A., Briviba, K., Oberley, T. D. & Scharfetter-Kochanek, K. (1999) *J. Biol. Chem.* **274**, 25869–25876.
- Rajagopalan, S., Meng, X. P., Ramasamy, S., Harrison, D. G. & Galis, Z. S. (1996) *J. Clin. Invest.* **98**, 2572–2579.
- Zhang, H. J., Zhao, W., Venkataraman, S., Robbins, M. E., Buettner, G. R., Kregel, K. C. & Oberley, L. W. (2002) *J. Biol. Chem.* **277**, 20919–20926.
- Gu, Z., Kaul, M., Yan, B., Kridel, S. J., Cui, J., Strongin, A., Smith, J. W., Liddington, R. C. & Lipton, S. A. (2002) *Science* **297**, 1186–1190.

Cbfa-1 mediates nitric oxide regulation of MMP-13 in osteoblasts

Carlos Zaragoza^{1,2,*}, Esther López-Rivera^{1,2}, Concepción García-Rama¹, Marta Saura³, Antonio Martínez-Ruiz^{1,2}, Tania R. Lizarbe^{1,2}, Fernando Martín-de-Lara² and Santiago Lamas^{1,2}

¹Fundación Centro Nacional de Investigaciones Cardiovasculares (CNIC), Melchor Fernández Almagro 3, 28029 Madrid, Spain

²Centro de Investigaciones Biológicas (CSIC), Instituto 'Reina Sofía' de Investigaciones Nefrológicas, Ramiro de Maeztu 9, 28040 Madrid, Spain

³Departamento de Fisiología, Facultad de Medicina, Universidad de Alcalá, Ctra de Barcelona, Km 33.5, 28871 Madrid, Spain

*Author for correspondence (e-mail: czaragoza@cnic.es)

Accepted 18 January 2006

Journal of Cell Science 119, 1896–1902 Published by The Company of Biologists 2006

doi:10.1242/jcs.02895

Summary

During bone development, osteoblast differentiation requires remodeling of the extracellular matrix. Although underlying mechanisms have not been elucidated, evidence points to the participation of the nitric oxide (NO) and cyclic guanosine 3',5'-monophosphate (cGMP) system. Here, we detected increased matrix metalloproteinase (MMP)-13 mRNA, protein and activity, as well as increased inducible NO synthase (iNOS) and NO production during the differentiation of MC3T3-E1 osteoblasts. Transcriptional activity of the MMP-13 promoter was augmented by NO, 8-bromo-cGMP (8-Br-cGMP), and by a dominant-positive form of protein kinase G (PKG1- α). The stimulatory effect on the MMP-13 promoter was partially inhibited by mutation of the osteoblast-specific element 2 (OSE-2) binding site. Core binding factor-1

(Cbfa-1) expression peaked at 7 days of differentiation, and was phosphorylated by PKG in vitro. Cbfa-1 was localized to cell nuclei, and its translocation was inhibited by the iNOS inhibitor 1400W. Immunohistological examination revealed that MMP-13 and Cbfa-1 expression levels are both reduced in 17-day-old embryos of iNOS-deficient mice. Silencing of Cbfa-1 mRNA blocked MMP-13 expression without interfering with endogenous NO production, confirming its role in NO-induced MMP-13 expression by MC3T3-E1 cells. The results described here suggest a mechanism by which NO regulates osteogenesis.

Key words: Matrix metalloproteinases, MMP-13, Nitric oxide, iNOS, Osteoblasts, cGMP/PKG, Bone development

Introduction

Bone development requires a complex remodeling of the extracellular matrix, and this is in large part mediated by matrix metalloproteinases (MMPs). Osteoblastic cells express several MMPs implicated in bone morphogenesis (Ortega et al., 2003), osteoblast and chondrocyte migration (Blavier and Delaisse, 1995; Onodera et al., 2004), unmineralized matrix degradation (Uchida et al., 2001), and cell invasion (Javed et al., 2005).

Evidence from gene-knockout studies shows that bone formation and resorption are regulated by nitric oxide (NO): mice deficient in endothelial NO synthase (eNOS) or cyclic guanosine 3',5'-monophosphate (cGMP)-dependent protein kinase (PKG) show bone abnormalities (Aguirre et al., 2001; Chae et al., 1997; Chikuda et al., 2004; Miyazawa et al., 2002; Otsuka et al., 1998; Talts et al., 1998) and inducible NO synthase (iNOS)-null mice show imbalances in bone osteogenesis (van't Hof et al., 2000). However, the mechanisms through which NO influences osteogenesis remain unclear.

The transcription factor core binding factor 1 (Cbfa-1; also called AML-3, Runx-2 and PEBP.2 α) is a key mediator of bone differentiation. Cbfa-1 is required for osteoblastic cell differentiation and ossification (Franceschi and Xiao, 2003; Lian et al., 2004), and its expression correlates with the transition of osteoblasts from the proliferative to the differentiated phenotype (Pratap et al., 2003). Cbfa-1 is closely

associated with osteogenic processes known to involve MMPs and NO. Cbfa-1 mediates NO-induced expression of genistein in murine bone marrow stromal cells (BMSCs) (Pan et al., 2005) and of osteoprotegerin in ovariectomized rats (Wang et al., 2004b) and the gene encoding MMP-13 is one of many regulated by Cbfa-1 in osteoblasts (Hess et al., 2001; Jimenez et al., 1999; Porte et al., 1999; Selvamurugan et al., 2000; Winchester et al., 2000).

It was already known that NO is involved in bone metabolism, that Cbfa-1 is implicated in mediating MMP expression, and that NO regulates the expression and activity of MMP-13 in endothelium (Lopez-Rivera et al., 2005); this led us to investigate the mechanisms responsible for such actions. Here, we investigated the action of NO during differentiation of the osteoblastic cell line MC3T3-E1. NO induces MMP-13 expression and activity, a process in which Cbfa-1 is required. Our findings further indicate that NO might phosphorylate Cbfa-1 by PKG, thereby suggesting a molecular mechanism through which NO regulates bone metabolism.

Results

MC3T3-E1 differentiation induces iNOS and MMP-13 expression, and NO regulates MMP-13 production

To test the expression of MMP-13 and iNOS in response to cell differentiation, we incubated MC3T3-E1 cells in the presence of 50 μ M ascorbic acid and 10 mM β -glycerol phosphate, to

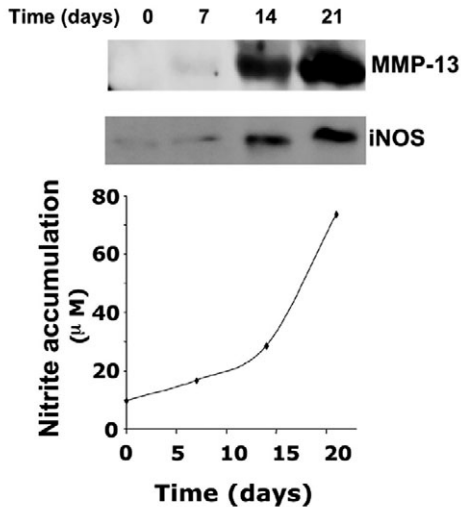


Fig. 1. MMP13 and iNOS protein levels during MC3T3-E1 differentiation. MC3T3-E1 cells were analyzed at the time points indicated in the presence of 50 μg/ml ascorbic acid and 10 mM β-glycerol phosphate. MMP-13 (upper panel) and iNOS (lower panel) were detected by immunoblot ($n=3$), whereas NO production was detected by Griess reaction (lower graph) ($n=3$).

induce osteoblast differentiation as reported (Fratzl-Zelman et al., 1998). After 14 and 21 days of incubation, we found a significant increase of MMP-13 protein and iNOS protein as detected by immunoblot, as well as NO production from culture supernatants collected at the time points indicated (Fig. 1).

MMP-13 has been previously reported by others to be induced by ascorbate-mediated differentiation of MC3T3-E1 cells (Mizutani et al., 2001). However, the contribution of NO on such effect is unknown. By incubating differentiated MC3T3-E1 cells with the pharmacological inhibitor of iNOS 1400W (200 μM), we found a decrease in MMP-13 levels (Fig. 2A), gelatinolytic activity (Fig. 2B) and MMP-13-associated activity (Fig. 2C), whereas MT1-MMP (a MMP expressed in MC3T3-E1 cells) did not show variation in response to 1400W (Fig. 2A, lower panel).

iNOS transcriptionally regulates MMP-13 expression in MC3T3-E1 cells

To analyze the effect of NO in the transcriptional regulation of MMP-13, we transiently transfected MC3T3-E1 with pMMP-13 WT, a plasmid containing the MMP-13 promoter region fused to a luciferase reporter gene. Administration of diethylamine NONOate (DEA-NO) (100 μM) induced the activity of MMP-13 promoter significantly above control cells, whereas incubation with 1400W alone (200 μM) brought MMP-13 promoter activity below basal levels (Fig. 3A).

We investigated the relevance of the NO-cGMP-PKG pathway in NO-mediated MMP-13 expression, and found that DEA-NO (100 μM) and the cGMP-soluble analog 8-Br-cGMP (10 μM) stimulated MMP-13 promoter activity. Furthermore, in cells challenged with the pharmacological inhibitor of soluble guanylate cyclase (sGC) [1,2,4]oxadiazolo[4,3-a]quinoxalin-1-one (ODQ) (20 μM), the stimulatory effect of NO was partially suppressed (Fig. 3B). In addition,

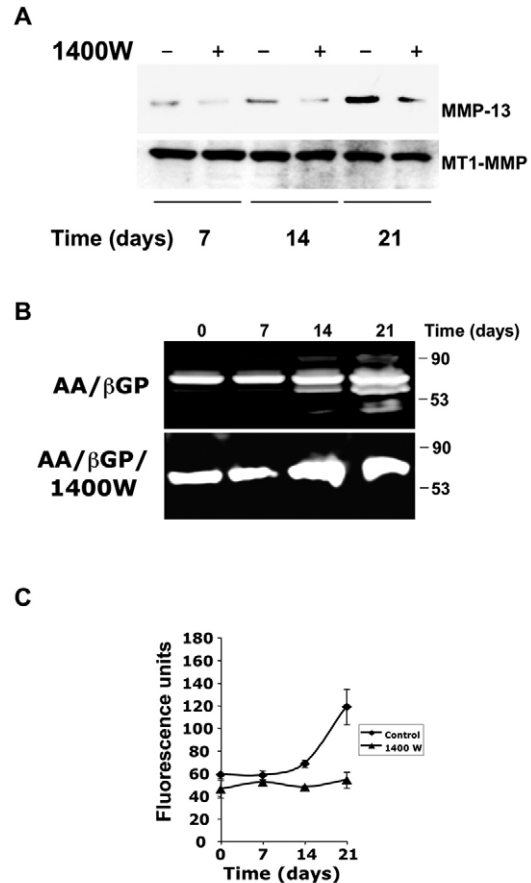


Fig. 2. NO reduces MMP-13 protein and MMP-13 activity during MC3T3-E1 differentiation. MC3T3-E1 cells were induced to differentiate with ascorbic acid (AA) and β-glycerol phosphate (βGP), and analyzed at the time points indicated in the presence or absence of 200 μM 1400W. (A) Immunoblot of MMP-13 and MT1-MMP ($n=3$). (B) Gelatin zymography ($n=3$). (C) Detection of MMP-13 activity by using a fluorogenic substrate from culture supernatants ($n=3$, mean \pm s.d.).

overexpression of the PKG1-α dominant-positive isoform (Zaragoza et al., 2002b) also stimulated MMP-13 promoter activity and MMP-13 expression (Fig. 3C).

To test the relevance of Cbfa-1 in MMP-13 expression mediated by the NO-cGMP pathway, MC3T3-E1 cells were transiently transfected with pMMP-13 WT or pMMP-13 OSE2, a plasmid encoding a mutation at the OSE-2 binding site of Cbfa-1. In cells transfected with pMMP-13 OSE2, the stimulatory effects of DEA-NO and 8-Br-cGMP were significantly reduced, as compared with cells transfected with pMMP-13 WT (Fig. 4A and 4B respectively), suggesting that the NO-cGMP pathway regulates the expression of MMP-13 in MC3T3-E1 by the targeted activation of Cbfa-1.

Nuclear localization of Cbfa-1 during MC3T3-E1 differentiation is prevented by inhibition of iNOS, and Cbfa-1 is phosphorylated by PKG in vitro
Cbfa-1 protein expression was markedly increased at day 7 of MC3T3-E1 differentiation (Fig. 5A). Participation of the NO-cGMP pathway seems unlikely since Cbfa-1 levels remained

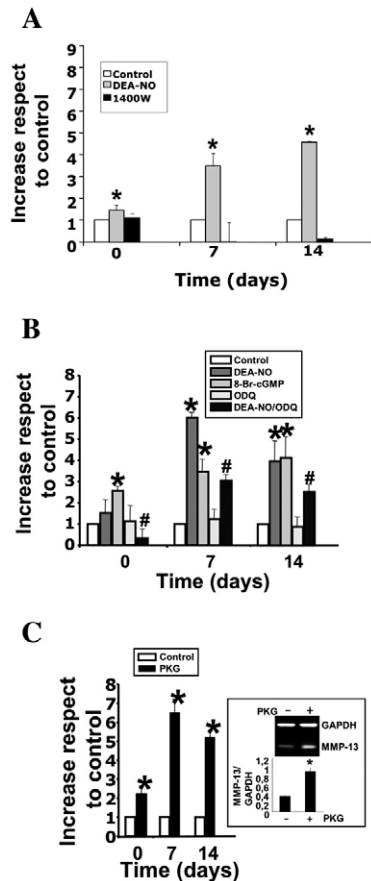


Fig. 3. The NO-cGMP-PKG pathway transcriptionally regulates MMP-13 expression during MC3T3-E1 differentiation. MC3T3-E1 cells were induced to differentiate and analyzed at the time points indicated. (A) MMP-13 promoter activity in MC3T3-E1 transiently transfected with pMMP-13 WT, and incubated with 100 μ M DEA-NO, or 200 μ M of the iNOS inhibitor 1400W ($n=3$, mean \pm s.d., $*P<0.05$ versus control). (B) Measurement of MMP-13 promoter activity in MC3T3-E1 cells transiently transfected with pMMP-13 WT, and incubated with 100 μ M DEA-NO, 10 μ M 8-Br-cGMP, 20 μ M ODQ, and 100 μ M DEA-NO plus 20 μ M ODQ ($n=3$, mean \pm s.d., $*P<0.05$ versus control, $#P<0.05$ versus DEA-NO). (C) Measurement of MMP-13 promoter activity in MC3T3-E1 cells transiently transfected with pMMP-13 WT and co-transfected with a dominant-positive construct of PKG1- α (black bars) ($n=3$, mean \pm s.d., $*P<0.05$ versus control). MMP-13 mRNA was evaluated in these cells by RT-PCR analysis using GAPDH as a control (inset shows a representative experiment and a densitometric analysis of three independent experiments, mean \pm s.d., $*P<0.05$ versus absence of PKG).

unchanged in the presence of either NO or 8Br-cGMP (Fig. 5B). Taking into account this result, we evaluated alternative effects of NO, which could explain the effect on Cbfa-1-mediated transcriptional activity of MMP-13. We first monitored the pattern of Cbfa-1 expression by confocal microscopy. Cell differentiation induced Cbfa-1 expression and nuclear localization by day 7 (Fig. 5C, panels i versus panels ii), whereas, strikingly, inhibition of iNOS with 1400W (200 μ M) markedly reduced nuclear localization of Cbfa-1 (Fig. 5C, day 7, panels iii versus panels ii), and the result was further confirmed by immunoblot of nuclear and cytosolic

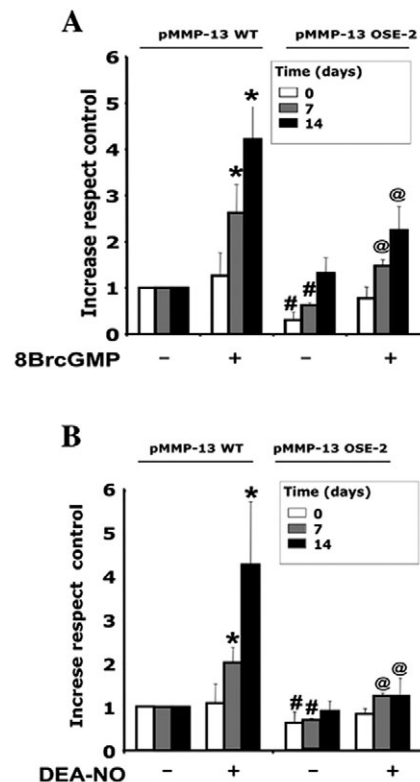


Fig. 4. The NO-cGMP-PKG pathway regulates MMP-13 expression through the Cbfa-1 responsive element OSE-2. Measurement of MMP-13 promoter activity in MC3T3-E1 cells transiently transfected with pMMP-13 WT or pMMP-13 OSE-2. (A) In the absence or presence of 8-Br-cGMP (8Br-cGMP). (B) In the absence or presence of DEA-NO ($n=3$, mean \pm s.d., $*P<0.05$ versus non-treated with 8-Br-cGMP or DEA-NO, $#P<0.05$ pMMP-13 OSE-2 versus pMMP-13 WT non-stimulated with 8-Br-cGMP or DEA-NO, $@P<0.05$ pMMP-13 OSE-2 versus pMMP-13 WT stimulated with 8-Br-cGMP or DEA-NO).

extracts from MC3T3-E1 cells at days 7 and 14 of differentiation (Fig. 5D). Taken together, these results suggest nuclear localization of Cbfa-1 as a mechanism elicited by NO during MMP-13 expression in MC3T3-E1 cells.

The fact that the NO-cGMP-PKG signaling pathway regulates Cbfa-1-mediated MMP-13 transcription, and taking into account that iNOS inhibition reduces nuclear levels of Cbfa-1, lead us to investigate if NO might regulate nuclear Cbfa-1 levels by PKG-mediated phosphorylation. During *in vitro* kinase assays, we found that recombinant purified Cbfa-1 was phosphorylated by recombinant PKG exclusively in the presence of cGMP (Fig. 5E, lane 4 versus lane 5). Autophosphorylation of PKG was also detected as reported by others (Chu et al., 1998; Smith et al., 2000). Thus, the NO-cGMP-PKG pathway might drive Cbfa-1-dependent gene expression in osteoblasts by regulating nuclear translocation of Cbfa-1.

Cbfa-1 expression is reduced in the embryos of iNOS-null mice

To analyze the influence of NO on Cbfa-1 localization *in vivo*, we detected the expression of Cbfa-1 and MMP-13 over a time

course of embryonic development in wild-type (WT) and iNOS-null mice (Fig. 6, mouse embryos at 17 days post-coitum). Cbfa-1 and MMP-13 levels were mostly detected in bone structures and, to a lesser extent, in surrounding tissues. However, in iNOS-null mice, the overall staining for Cbfa-1 and MMP-13 was significantly reduced (Fig. 6; Cbfa-1, A versus C; MMP-13, B versus D). A more detailed analysis shows a clear reduction in iNOS-null embryos of MMP-13 and Cbfa-1 in the ribs (Fig. 6; MMP-13, J versus L; Cbfa-1, I versus K) and vertebrae (Fig. 6; MMP-13, N versus P; Cbfa-1, M

versus O). A similar pattern could also be detected in craniofacial structures. The Meckel's cartilage was negative for MMP-13 and Cbfa-1 in iNOS WT and iNOS-null embryos, as well as chondrogenic regions of vertebrae. However, MMP-13 and Cbfa-1 levels were reduced in the nasal bones, frontal bones and mandibles of iNOS-null embryos (Fig. 6; MMP-13, F versus H; Cbfa-1, E versus G), pointing towards the relevance of iNOS during mouse development. This result was further verified by immunoblot of lysates from 17-day-old WT and iNOS-deficient embryos (Fig. 6Q).

NO-cGMP-mediated expression of MMP-13 depends on Cbfa-1

To determine the contribution of Cbfa-1 to NO-mediated MMP-13 expression, we silenced the expression of Cbfa-1 by RNA interference. In cells in which Cbfa-1 was silenced, MMP-13 protein abundance was three times lower than in non-silenced cells (Fig. 7, upper left), even when NO levels increased as a result of cell differentiation (Fig. 7, lower graph). By contrast, gene silencing of GAPDH did not affect either MMP-13 or Cbfa-1 expression levels (Fig. 7, upper right). This result suggests that, even when NO levels are kept high, the presence of Cbfa-1 is essential for MMP-13 expression. This is consistent with the concept of Cbfa-1 as a target for NO-cGMP-PKG in the expression of MMP-13 in this osteoblastic cell line.

Discussion

Our results indicate that NO is an important mediator in the expression of MMP-13 during osteoblast differentiation, providing insights into the molecular signaling pathways activated by NO.

The active involvement of NO in bone healing (Corbett et al., 1999; Diwan et al., 2000; Wang et al., 2004a; Zhu et al., 2001), bone development (Aguirre et al., 2001; Armour et al., 2001; Collin-Osdoby et al., 1995; Turner et al., 1997; van't Hof and Ralston, 2001) and bone loss (Cuzzocrea et al., 2003; Wang et al., 2004b) has been reported. Mice lacking eNOS present profound abnormalities in bone formation, and osteoblasts from calvarial explants show retarded proliferation and differentiation. However, the molecular target(s) of NO are not well understood. MMPs, and in particular MMP-13, can be considered good candidates for the actions of NO, owing to their crucial involvement in bone healing (Henle et al., 2005; Yamagiwa et al., 1999; Yang et al., 2004), bone development (Inada et al., 2004; Stickens et al., 2004) and bone loss (Pelletier et al., 2004). Previous work has shown that the transcription factor Cbfa-1, which is fundamental to osteoblast differentiation and regulates the expression of different MMPs, is significantly reduced in osteoblasts from neonatal eNOS-null mice (Afzal et al., 2004). Even when MMP-13 induction in differentiating osteoblasts has been documented (Mizutani et al., 2001), the relationship between NO and MMP-13 expression in bone cells has not been investigated. We found that osteoblast differentiation induced iNOS expression, and that iNOS regulates MMP-13 protein in MC3T3-E1 cells at the transcriptional level through the cGMP pathway, through the activation of the transcription factor Cbfa-1.

The increase of iNOS expression led us to investigate the

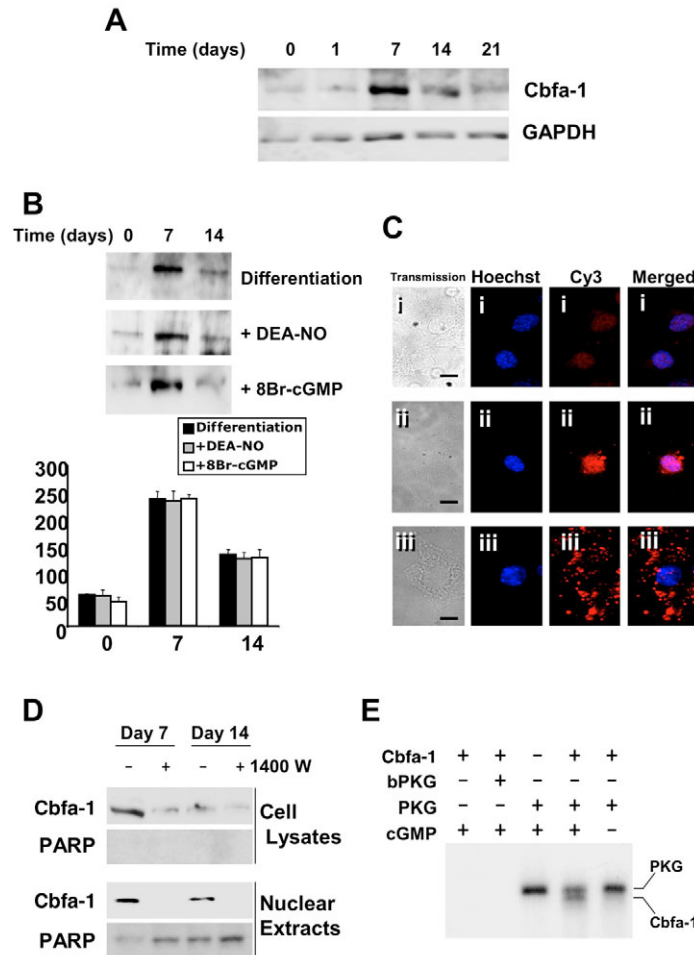


Fig. 5. Effect of the NO-cGMP-PKG pathway on Cbfa-1 regulation in MC3T3-E1 cells. (A) Immunoblot analysis of Cbfa-1 over a time course of MC3T3-E1 differentiation ($n=3$). (B) Immunoblot analysis of Cbfa-1 over a time course of MC3T3-E1 differentiation in the presence of DEA-NO or 8Br-cGMP ($n=3$). (C) Immunocytochemistry analysis of Cbfa-1 (red) at day 7 of MC3T3-E1 differentiation. Cells were induced to differentiate (ii), or not (i), or induced to differentiate in the presence of 200 μ M 1400W (iii). Nuclei were visualized with Hoechst (blue) ($n=3$). Bars, 25 μ m. (D) Cbfa-1 expression from nuclear extracts and cytosolic extracts of MC3T3-E1 after 7 and 14 days of differentiation. PARP was detected as a control for nuclear integrity ($n=3$). (E) Recombinant Cbfa-1 (2 μ g) was incubated with 100 units of PKG or 100 units of denatured PKG (bPKG) in phosphorylation buffer (see Materials and Methods), containing 1 μ Ci of [32 P] γ -ATP, in the presence or absence of 100 μ M cGMP. Samples were electrophoresed and phosphorylation was visualized by autoradiography ($n=2$).

effect on MMP-13 in vivo. The analysis of Cbfa-1 and MMP-13 in WT and iNOS-deficient mouse embryos revealed a marked reduction in the expression of both proteins in the absence of NO. Taken together, these results point towards MMP-13 as a target for the role of NO in bone development, and Cbfa-1 as a mediator of its action.

MMP-13 and Cbfa-1 have important roles in bone formation (Stahle-Backdahl et al., 1997). The mechanism leading to increased MMP-13 expression in osteoblasts depends on Cbfa-1 activation (Hess et al., 2001; Jimenez et al., 1999; Porte et al.,

1999; Selvamurugan et al., 2000; Winchester et al., 2000). By inhibiting the expression of Cbfa-1 in RNA interference assays, we found that Cbfa-1 regulates NO-mediated MMP-13 expression in MC3T3-E1 cells. Cbfa-1 expression peaked after 7 days of MC3T3-E1 differentiation [as shown by others (Perinpanayagam et al., 2004)], whereas MMP-13 was maximal after 14 days. Cbfa-1 expression is not regulated by NO. However, the presence of Cbfa-1 in the nucleus was still evident at day 14 of differentiation (Fig. 5D), and the process appears to be dependent on NO, thus accounting for the effect on MMP-

13 expression. In addition, Cbfa-1 enables cells to evade proliferation (Pratap et al., 2003) and Cbfa-1 expression has been reported to be negatively regulated by Cbfa-1 itself in cultured cells, which could provide a negative-feedback loop that might be used as a repression mechanism (Tou et al., 2003).

Involvement of the NO-cGMP in the activation of Cbfa-1-mediated gene expression has been reported in the case of genistein (Pan et al., 2005). The results shown here, as well as in endothelial cells (Zaragoza et al., 2002a; Zaragoza et al., 2002b), identify cGMP as a mediator of NO-induced expression of MMP-13. In this setting, phosphorylation of Cbfa-1 by PKG might have an important role. Cbfa-1 activity is inhibited by protein kinase inhibitors. In particular, NO increases osteoprotegerin expression through the activation of Cbfa-1 in ovariectomized rats, and the effect is inhibited with herbimycin A (Wang et al., 2004b), a tyrosine kinase inhibitor. Cbfa-1 might become phosphorylated by the mitogen-activated protein kinase (MAPK)-extracellular signal-regulated protein kinase (ERK) pathway, and by protein kinase A (PKA) under certain conditions (Franceschi et al., 2003). However, the kinase(s) responsible for NO-mediated Cbfa-1 activation have not been identified yet. In endothelial cells, MMP-13 expression is regulated by NO through the cGMP-PKG and ERK pathways (Zaragoza et al., 2002b). Taking into account the data shown by others (Franceschi et al., 2003; Pan et al., 2005), and the fact that overexpression of PKG stimulates both the activity of the MMP-13 promoter and MMP-13 expression, we infer that, in osteoblasts, PKG is also able to phosphorylate Cbfa-1. Our in vitro phosphorylation assays confirm that recombinant PKG phosphorylates Cbfa-1 in a cGMP-dependent manner. In silico analysis reveals three putative consensus sequences of Cbfa-1 susceptible to PKG phosphorylation (Thr89, Thr104, Ser340).

Our data provide a link between NO and Cbfa-1, which converge on the expression of MMP-13, and which might have consequences for bone osteogenesis. Future work should contribute to deciphering the pathophysiological relevance of this pathway in animal and human models of disease.

Materials and Methods

Mice and cells

Wild-type C57BL/6 mice and mice disrupted for the gene encoding iNOS were housed in our animal facilities in isolated rooms. Mouse

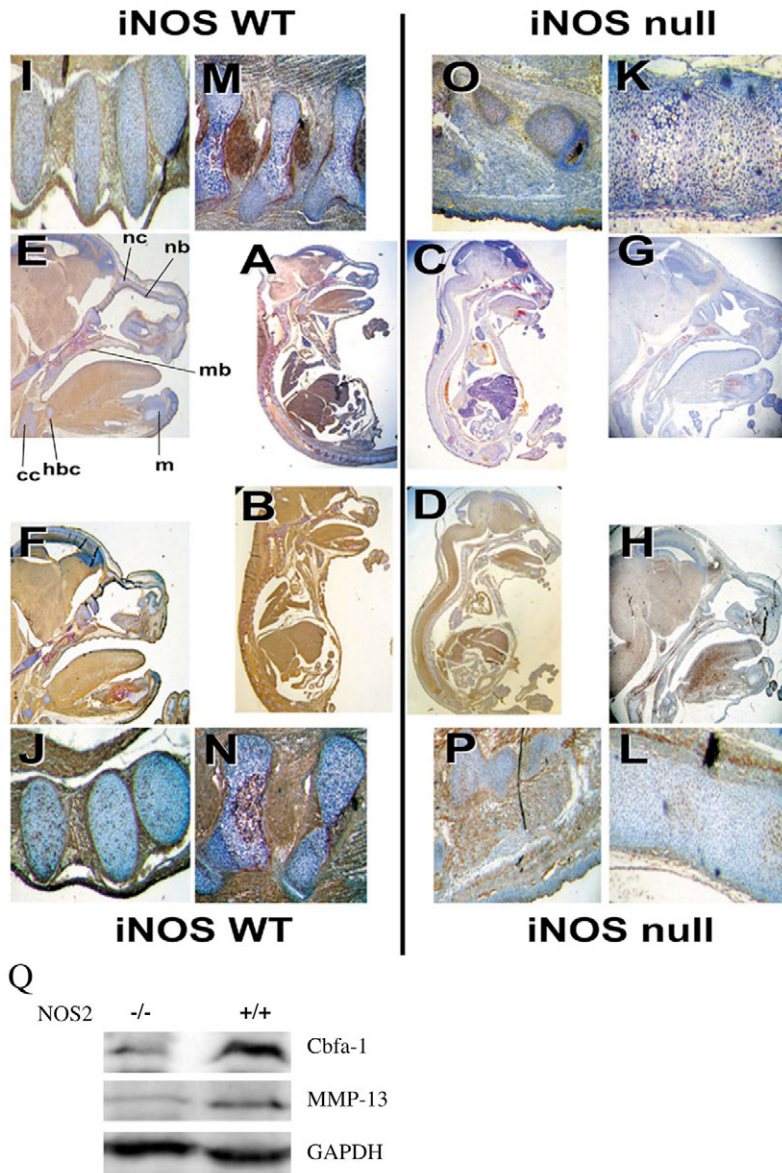


Fig. 6. Cbfa-1 and MMP-13 expression are reduced in iNOS-deficient embryos. Immunohistological detection of Cbfa-1 (A,C,E,G,I,K,M,O) and MMP-13 (B,D,F,H,J,L,N,P) on sections from iNOS wild-type (WT) (left side) and iNOS-deficient (right side) 17-day-old embryos. Experiments were performed in triplicate on sections from three different embryos. Skulls (E,F,G,H), ribs (I,J,K,L) and vertebrae (M,N,O,P) are magnified. m, Meckel's cartilage; mb, maxillary bone; nb, nasal bone; hbc, cartilage of the hyoid bone; cc, cricoid cartilage. (Q) Immunoblot detecting the levels of Cbfa-1, MMP-13 and GAPDH from WT (+/) and iNOS-deficient (NOS2, -/-) mouse embryo lysates ($n=3$).

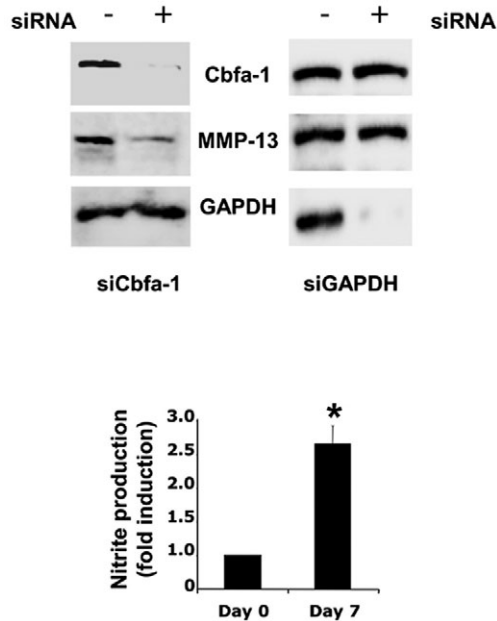


Fig. 7. Cbfa-1 is required for NO-induced MMP-13 expression in differentiating MC3T3-E1 cells. MC3T3-E1 cells were differentiated and, on day 7, Cbfa-1 and GAPDH expression were silenced by RNA interference (siRNA). Cbfa-1, MMP-13 and GAPDH expression were evaluated by immunoblot. The capacity of Cbfa-1-silenced cells to produce NO was evaluated by measuring nitrite accumulation from culture supernatants (lower panel: $n=3$, mean \pm s.d., * $P<0.05$ versus day 0).

embryos were isolated at regular intervals, embedded in paraffin and sections were obtained for immunohistochemistry.

The osteoblastic cell line MC3T3-E1 was kindly donated by M. Ángel Peñalva (CIB, CSIC, Madrid, Spain). MC3T3-E1 monolayers were grown in 6-well plates, and fed with α -minimal essential medium (α -MEM), supplemented with 10% FBS and antibiotics. To differentiate MC3T3-E1, cells were cultured for 21 days in the presence of ascorbic acid (50 μ g/ml) and β -glycerol phosphate (10 mM).

Reagents

Cell culture supplies were from Falcon (Beckton-Dickson), serum was from BioWhittaker, antibiotics were from Sigma, RT-PCR reagents were from GIBCO and Taq DNA polymerase was from Applied Biosystems. The Dual Luciferase Reporter System, RNAase inhibitor RNasin, pGL3 plasmids and restriction endonucleases were from Promega. Autoradiography film was from Kodak. Polyvinylidene fluoride (PVDF) protein transfer membranes were from Millipore, and the electrochemiluminescence (ECL)-detecting immunoblot system was from GE. Optimum and Lipofectamine were from GIBCO-BRL. EDTA-free protease inhibitor cocktail tablets were from Roche. Polyclonal antibodies to MMP-13, and active bovine protein kinase G, isoform 1 α (from *Spodoptera frugiperda*) were from Calbiochem. Anti-Cbfa-1 monoclonal and anti-iNOS polyclonal antibodies were from SantaCruz Biotechnologies. Anti-MT1-MMP antibody was kindly donated by A. García-Arroyo (CNIC, Madrid, Spain). The Silencer siRNA Construction Kit was from Ambion.

Plasmids

Plasmid pMMP-13 WT contains a functional part of the 5' promoter of the human MMP-13 (GenBank accession no: NM_002427) located upstream of a luciferase reporter gene. Plasmid pMMP-13 OSE-2 is identical to pMMP-13 WT except for a mutation at the OSE-2 responsive element (Pendas et al., 1997). Dominant-positive PKG, containing the catalytic subunit of cGMP-dependent protein kinase, was expressed in MC3T3-E1 cells as described (Zaragoza et al., 2002b). Recombinant Cbfa-1 was cloned by inserting Cbfa-1 cDNA into the *SphI* and *Sall* restriction sites of the pQ30 vector (Qiagen).

Nitrite assay

Nitrite concentration in culture supernatants was determined by a modification of the Griess assay as described (Zaragoza et al., 2002b).

Immunoblot analysis

Cell lysate extraction and protein immunoblots were performed as described (Zaragoza et al., 2002b).

Transient transfection of MC3T3-E1 cells

Transient transfections were conducted with Lipofectamine 2000 reagent as described (Zaragoza et al., 2002b). MMP-13 promoter activity was measured by the expression of the luciferase gene reporter. Experiments were carried out using the Dual Luciferase Reporter system, co-transfecting BAEC with a pGL3 reporter plasmid expressing Renilla under the control of a CMV promoter (pCMV-Renilla).

Gelatin zymography

MC3T3-E1 culture supernatants were collected over a time course of differentiation, and gelatin zymography was conducted using pre-cast Biorad gelatin zymogram gels, according to the manufacturer's instructions.

MMP-13 activity assay

MMP-13 activity was assayed fluorimetrically using a fluorescent substrate from Chemicon as previously described (Zaragoza et al., 2002a).

RNA isolation and RT-PCR

Total RNA was isolated by the guanidinium thiocyanate method as described (Chomczynski and Sacchi, 1987). RNA was detected by real-time quantitative RT-PCR, as previously described (Zaragoza et al., 2002b). The following primers were selected: sense primer, 5'-CCAAATTATGAGGAGATGC-3'; antisense primer, 5'-CGCCAGAAGAATCTGTCTTTAAA-3'. As a reference gene, we used the following primer set for glyceraldehyde-3 phosphate dehydrogenase (GAPDH): sense primer, 5'-AGTGGGTGATGCTGGTGCTG-3'; antisense primer, 5'-CGCCTGCTTACCACCTTCTT-3'. The specificity of the amplification was verified by resolution of the PCR products on ethidium bromide agarose gels.

Gene silencing

Cbfa-1 or GAPDH expression were silenced in MC3T3-E1 cells by transient transfection of cells with pre-annealed siRNA oligonucleotides, corresponding to specific regions of the murine Cbfa-1 and GAPDH genes (pre-validated siRNAs; Ambion), as described (Lopez-Rivera et al., 2005).

Confocal microscopy

MMP-13 and Cbfa-1 from MC3T3-E1 were detected by confocal microscopy as previously described (Lopez-Rivera et al., 2005).

In vitro phosphorylation assay

Recombinant Cbfa-1 was purified by nickel chromatography as described (Lopez-Rivera et al., 2005). The efficacy of PKG to phosphorylate Cbfa-1 was tested by incubating both proteins in the presence or absence of cGMP in phosphorylation buffer (20 mM Tris HCl, pH 7.5; 10 mM MgCl₂; 10 mM DTT; 20 mM ATP; 10 μ M NaF), containing 10 μ Ci [γ -³²P]ATP, for 30 minutes at room temperature. Proteins were then electrophoresed on 10% PAGE; the gels were washed with 10% acetic acid, dried and exposed to autoradiography.

Statistical analysis

Unless otherwise specified, data are expressed as means \pm s.d., and experiments were performed at least three times in duplicate. Comparisons were made by non-parametric statistics using the Wilcoxon Rank-Sum test whenever comparisons were made with a common control. The level of statistical significance was defined as $P<0.05$. Error bars represent \pm s.d.

This work was supported by the following grants: C.Z. (Ministerio de Ciencia y Tecnología Plan Nacional de I+D+I SAF 2002-00399. Ministerio de Educación y Ciencia Plan Nacional de I+D+I SAF2005-06025) C.Z. and M.S. ('Programa Ramón y Cajal'. Comunidad Autónoma de Madrid 08.4/0023/2003), S.L. (European Union FEDER 2FD97-1432. Plan Nacional de I+D+I SAF 2000-0149, and SAF 2003-01039), C.Z. and S.L. (Grant-in-aid from the Spanish Society of Nephrology 2001, and 'Red temática de investigación cooperativa RECAVA C03/01 from Ministerio de Sanidad y Consumo').

References

- Afzal, F., Polak, J. and Buttery, L. (2004). Endothelial nitric oxide synthase in the control of osteoblastic mineralizing activity and bone integrity. *J. Pathol.* **202**, 503-510.
- Aguiar, J., Buttery, L., O'Shaughnessy, M., Afzal, F., Fernandez de Marticorena, I., Hukkanen, M., Huang, P., MacIntyre, I. and Polak, J. (2001). Endothelial nitric oxide synthase gene-deficient mice demonstrate marked retardation in postnatal bone formation, reduced bone volume, and defects in osteoblast maturation and activity. *Am. J. Pathol.* **158**, 247-257.

- Armour, K. E., Armour, K. J., Gallagher, M. E., Godecke, A., Helfrich, M. H., Reid, D. M. and Ralston, S. H. (2001). Defective bone formation and anabolic response to exogenous estrogen in mice with targeted disruption of endothelial nitric oxide synthase. *Endocrinology* **142**, 760-766.
- Blavier, L. and Delaisse, J. M. (1995). Matrix metalloproteinases are obligatory for the migration of preosteoclasts to the developing marrow cavity of primitive long bones. *J. Cell Sci.* **108**, 3649-3659.
- Chae, H. J., Park, R. K., Chung, H. T., Kang, J. S., Kim, M. S., Choi, D. Y., Bang, B. G. and Kim, H. R. (1997). Nitric oxide is a regulator of bone remodelling. *J. Pharm. Pharmacol.* **49**, 897-902.
- Chikuda, H., Kugimiya, F., Hoshi, K., Ikeda, T., Ogasawara, T., Shimoaka, T., Kawano, H., Kamekura, S., Tsuchida, A., Yokoi, N. et al. (2004). Cyclic GMP-dependent protein kinase II is a molecular switch from proliferation to hypertrophic differentiation of chondrocytes. *Genes Dev.* **18**, 2418-2429.
- Chomczynski, P. and Sacchi, N. (1987). Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal. Biochem.* **162**, 156-159.
- Chu, D. M., Francis, S. H., Thomas, J. W., Maksymovitch, E. A., Fosler, M. and Corbin, J. D. (1998). Activation by autophosphorylation or cGMP binding produces a similar apparent conformational change in cGMP-dependent protein kinase. *J. Biol. Chem.* **273**, 14649-14656.
- Collin-Osoby, P., Nickols, G. A. and Osoby, P. (1995). Bone cell function, regulation, and communication: a role for nitric oxide. *J. Cell. Biochem.* **57**, 399-408.
- Corbett, S. A., Hukkanen, M., Batten, J., McCarthy, I. D., Polak, J. M. and Hughes, S. P. (1999). Nitric oxide in fracture repair. Differential localisation, expression and activity of nitric oxide synthases. *J. Bone Joint Surg. Br.* **81**, 531-537.
- Cuzzocrea, S., Mazzon, E., Dugo, L., Genovese, T., Di Paola, R., Ruggeri, Z., Vegeto, E., Caputi, A. P., Van De Loo, F. A., Puzzolo, D. et al. (2003). Inducible nitric oxide synthase mediates bone loss in ovariectomized mice. *Endocrinology* **144**, 1098-1107.
- Diwan, A. D., Wang, M. X., Jang, D., Zhu, W. and Murrell, G. A. (2000). Nitric oxide modulates fracture healing. *J. Bone Miner. Res.* **15**, 342-351.
- Franceschi, R. T. and Xiao, G. (2003). Regulation of the osteoblast-specific transcription factor, Runx2: responsiveness to multiple signal transduction pathways. *J. Cell. Biochem.* **88**, 446-454.
- Franceschi, R. T., Xiao, G., Jiang, D., Gopalakrishnan, R., Yang, S. and Reith, E. (2003). Multiple signaling pathways converge on the Cbfa1/Runx2 transcription factor to regulate osteoblast differentiation. *Connect. Tissue Res.* **44**, Suppl. 1, 109-116.
- Fratzl-Zelman, N., Fratzl, P., Horandner, H., Grabner, B., Varga, F., Ellinger, A. and Klaushofer, K. (1998). Matrix mineralization in MC3T3-E1 cell cultures initiated by beta-glycerophosphate pulse. *Bone* **23**, 511-520.
- Henle, P., Zimmermann, G. and Weiss, S. (2005). Matrix metalloproteinases and failed fracture healing. *Bone* **37**, 791-798.
- Hess, J., Porte, D., Munz, C. and Angel, P. (2001). AP-1 and Cbfa/runt physically interact and regulate parathyroid hormone-dependent MMP13 expression in osteoblasts through a new osteoblast-specific element 2/AP-1 composite element. *J. Biol. Chem.* **276**, 20029-20038.
- Inada, M., Wang, Y., Byrne, M. H., Rahman, M. U., Miyaura, C., Lopez-Otin, C. and Krane, S. M. (2004). Critical roles for collagenase-3 (Mmp13) in development of growth plate cartilage and in endochondral ossification. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **101**, 17192-17197.
- Javed, A., Barnes, G. L., Pratap, J., Antkowiak, T., Gerstenfeld, L. C., van Wijnen, A. J., Stein, J. L., Lian, J. B. and Stein, G. S. (2005). Impaired intranuclear trafficking of Runx2 (AML3/CBFA1) transcription factors in breast cancer cells inhibits osteolysis in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **102**, 1454-1459.
- Jimenez, M. J., Balbin, M., Lopez, J. M., Alvarez, J., Komori, T. and Lopez-Otin, C. (1999). Collagenase 3 is a target of Cbfa1, a transcription factor of the runt gene family involved in bone formation. *Mol. Cell. Biol.* **19**, 4431-4442.
- Lian, J. B., Javed, A., Zaidi, S. K., Lengner, C., Montecino, M., van Wijnen, A. J., Stein, J. L. and Stein, G. S. (2004). Regulatory controls for osteoblast growth and differentiation: role of Runx/Cbfa/AML factors. *Crit. Rev. Eukaryot. Gene Expr.* **14**, 1-41.
- Lopez-Rivera, E., Lizarbe, T. R., Martinez-Moreno, M., Lopez-Novoa, J. M., Rodriguez-Barbero, A., Rodrigo, J., Fernandez, A. P., Alvarez-Barrientos, A., Lamas, S. and Zaragoza, C. (2005). Matrix metalloproteinase 13 mediates nitric oxide activation of endothelial cell migration. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **102**, 3685-3690.
- Miyazawa, T., Ogawa, Y., Chusho, H., Yasoda, A., Tamura, N., Komatsu, Y., Pfeifer, A., Hofmann, F. and Nakao, K. (2002). Cyclic GMP-dependent protein kinase II plays a critical role in C-type natriuretic peptide-mediated endochondral ossification. *Endocrinology* **143**, 3604-3610.
- Mizutani, A., Sugiyama, I., Kuno, E., Matsunaga, S. and Tsukagoshi, N. (2001). Expression of matrix metalloproteinases during ascorbate-induced differentiation of osteoblastic MC3T3-E1 cells. *J. Bone Miner. Res.* **16**, 2043-2049.
- Onodera, S., Nishihira, J., Yamazaki, M., Ishibashi, T. and Minami, A. (2004). Increased expression of macrophage migration inhibitory factor during fracture healing in rats. *Histochem. Cell Biol.* **121**, 209-217.
- Ortega, N., Behonick, D., Stickens, D. and Werb, Z. (2003). How proteases regulate bone morphogenesis. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **995**, 109-116.
- Otsuka, E., Hirano, K., Matsushita, S., Inoue, A., Hirose, S., Yamaguchi, A. and Hagiwara, H. (1998). Effects of nitric oxide from exogenous nitric oxide donors on osteoblastic metabolism. *Eur. J. Pharmacol.* **349**, 345-350.
- Pan, W., Quarles, L. D., Song, L. H., Yu, Y. H., Jiao, C., Tang, H. B., Jiang, C. H., Deng, H. W., Li, Y. J., Zhou, H. H. et al. (2005). Genistein stimulates the osteoblastic differentiation via NO/cGMP in bone marrow culture. *J. Cell. Biochem.* **94**, 307-316.
- Pelletier, J. P., Boileau, C., Brunet, J., Boily, M., Lajeunesse, D., Reboul, P., Laufer, S. and Martel-Pelletier, J. (2004). The inhibition of subchondral bone resorption in the early phase of experimental dog osteoarthritis by licofelone is associated with a reduction in the synthesis of MMP-13 and cathepsin K. *Bone* **34**, 527-538.
- Pendas, A. M., Balbin, M., Llano, E., Jimenez, M. G. and Lopez-Otin, C. (1997). Structural analysis and promoter characterization of the human collagenase-3 gene (MMP13). *Genomics* **40**, 222-233.
- Perinpanayagam, H., Schneider, G., Holtman, K., Zaharias, R. and Stanford, C. (2004). Altered Cbfa1 expression and biomineralization in an osteosarcoma cell line. *J. Orthop. Res.* **22**, 404-410.
- Porte, D., Tuckermann, J., Becker, M., Baumann, B., Teurich, S., Higgins, T., Owen, M. J., Schorpp-Kistner, M. and Angel, P. (1999). Both AP-1 and Cbfa1-like factors are required for the induction of interstitial collagenase by parathyroid hormone. *Oncogene* **18**, 667-678.
- Pratap, J., Galindo, M., Zaidi, S. K., Vradii, D., Bhat, B. M., Robinson, J. A., Choi, J. Y., Komori, T., Stein, J. L., Lian, J. B. et al. (2003). Cell growth regulatory role of Runx2 during proliferative expansion of preosteoblasts. *Cancer Res.* **63**, 5357-5362.
- Selvamurugan, N., Brown, R. J. and Partridge, N. C. (2000). Regulation of collagenase-3 gene expression in osteoblastic and non-osteoblastic cell lines. *J. Cell. Biochem.* **79**, 182-190.
- Smith, J. A., Reed, R. B., Francis, S. H., Grimes, K. and Corbin, J. D. (2000). Distinguishing the roles of the two different cGMP-binding sites for modulating phosphorylation of exogenous substrate (heterophosphorylation) and autophosphorylation of cGMP-dependent protein kinase. *J. Biol. Chem.* **275**, 154-158.
- Stahle-Backdahl, M., Sandstedt, B., Bruce, K., Lindahl, A., Jimenez, M. G., Vega, J. A. and Lopez-Otin, C. (1997). Collagenase-3 (MMP-13) is expressed during human fetal ossification and re-expressed in postnatal bone remodeling and in rheumatoid arthritis. *Lab. Invest.* **76**, 717-728.
- Stickens, D., Behonick, D. J., Ortega, N., Heyer, B., Hartenstein, B., Yu, Y., Fosang, A. J., Schorpp-Kistner, M., Angel, P. and Werb, Z. (2004). Altered endochondral bone development in matrix metalloproteinase 13-deficient mice. *Development* **131**, 5883-5895.
- Talts, J. F., Pfeifer, A., Hofmann, F., Hunziker, E. B., Zhou, X. H., Aszodi, A. and Fassler, R. (1998). Endochondral ossification is dependent on the mechanical properties of cartilage tissue and on intracellular signals in chondrocytes. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **857**, 74-85.
- Tou, L., Quibria, N. and Alexander, J. M. (2003). Transcriptional regulation of the human Runx2/Cbfa1 gene promoter by bone morphogenetic protein-7. *Mol. Cell Endocrinol.* **205**, 121-129.
- Turner, C. H., Owan, I., Jacob, D. S., McClintock, R. and Peacock, M. (1997). Effects of nitric oxide synthase inhibitors on bone formation in rats. *Bone* **21**, 487-490.
- Uchida, M., Shima, M., Chikazu, D., Fujieda, A., Obara, K., Suzuki, H., Nagai, Y., Yamato, H. and Kawaguchi, H. (2001). Transcriptional induction of matrix metalloproteinase-13 (collagenase-3) by 1 α ,25-dihydroxyvitamin D3 in mouse osteoblastic MC3T3-E1 cells. *J. Bone Miner. Res.* **16**, 221-230.
- van't Hof, R. J. and Ralston, S. H. (2001). Nitric oxide and bone. *Immunology* **103**, 255-261.
- van't Hof, R. J., Armour, K. J., Smith, L. M., Armour, K. E., Wei, X. Q., Liew, F. Y. and Ralston, S. H. (2000). Requirement of the inducible nitric oxide synthase pathway for IL-1-induced osteoclastic bone resorption. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **97**, 7993-7998.
- Wang, F. S., Kuo, Y. R., Wang, C. J., Yang, K. D., Chang, P. R., Huang, Y. T., Huang, H. C., Sun, Y. C., Yang, Y. J. and Chen, Y. J. (2004a). Nitric oxide mediates ultrasound-induced hypoxia-inducible factor-1 α activation and vascular endothelial growth factor-A expression in human osteoblasts. *Bone* **35**, 114-123.
- Wang, F. S., Wang, C. J., Chen, Y. J., Huang, Y. T., Huang, H. C., Chang, P. R., Sun, Y. C. and Yang, K. D. (2004b). Nitric oxide donor increases osteoprotegerin production and osteoclastogenesis inhibitory activity in bone marrow stromal cells from ovariectomized rats. *Endocrinology* **145**, 2148-2156.
- Winchester, S. K., Selvamurugan, N., D'Alonzo, R. C. and Partridge, N. C. (2000). Developmental regulation of collagenase-3 mRNA in normal, differentiating osteoblasts through the activator protein-1 and the runt domain binding sites. *J. Biol. Chem.* **275**, 23310-23318.
- Yamagiwa, H., Tokunaga, K., Hayami, T., Hatano, H., Uchida, M., Endo, N. and Takahashi, H. E. (1999). Expression of metalloproteinase-13 (Collagenase-3) is induced during fracture healing in mice. *Bone* **25**, 197-203.
- Yang, C. M., Chien, C. S., Yao, C. C., Hsiao, L. D., Huang, Y. C. and Wu, C. B. (2004). Mechanical strain induces collagenase-3 (MMP-13) expression in MC3T3-E1 osteoblastic cells. *J. Biol. Chem.* **279**, 22158-22165.
- Zaragoza, C., Balbin, M., Lopez-Otin, C. and Lamas, S. (2002a). Nitric oxide regulates matrix metalloproteinase-13 expression and activity in endothelium. *Kidney Int.* **61**, 804-808.
- Zaragoza, C., Soria, E., Lopez, E., Browning, D., Balbin, M., Lopez-Otin, C. and Lamas, S. (2002b). Activation of the mitogen activated protein kinase extracellular signal-regulated kinase 1 and 2 by the nitric oxide-cGMP-cGMP-dependent protein kinase axis regulates the expression of matrix metalloproteinase 13 in vascular endothelial cells. *Mol. Pharmacol.* **62**, 927-935.
- Zhu, W., Diwan, A. D., Lin, J. H. and Murrell, G. A. (2001). Nitric oxide synthase isoforms during fracture healing. *J. Bone Miner. Res.* **16**, 535-540.

Viral protease cleavage of inhibitor of $\kappa B\alpha$ triggers host cell apoptosis

Carlos Zaragoza^{*†}, Marta Saura^{*‡}, Elizaveta Y. Padalko[§], Ester Lopez-Rivera^{*}, Tania R. Lizarbe^{*}, Santiago Lamas^{*†}, and Charles J. Lowenstein[§]

^{*}Fundación Centro Nacional de Investigaciones Cardiovasculares, Melchor Fernandez Almagro 3, 28029 Madrid, Spain; [†]Departamento de Fisiología, Facultad de Medicina, Universidad de Alcalá, Carretera Barcelona Km 33, 28017 Alcalá de Henares, Spain; [‡]Division of Cardiology, Department of Medicine, Johns Hopkins University School of Medicine, 720 Rutland Avenue, Ross 950, Baltimore, MD 21205; and [§]Centro de Investigaciones Biológicas, Instituto Reina Sofía de Investigaciones Nefrológicas, 28006 Madrid, Spain

Edited by Peter Palese, Mount Sinai School of Medicine, New York, NY, and approved October 6, 2006 (received for review July 17, 2006)

Apoptosis is an innate immune response to viral infection that limits viral replication. However, the mechanisms by which cells detect viral infection and activate apoptosis are not completely understood. We now show that during Coxsackievirus infection, the viral protease 3C^{pro} cleaves inhibitor of $\kappa B\alpha$ (I $\kappa B\alpha$). A proteolytic fragment of I $\kappa B\alpha$ then forms a stable complex with NF- κB , translocates to the nucleus, and inhibits NF- κB transactivation, increasing apoptosis and decreasing viral replication. In contrast, cells with reduced I $\kappa B\alpha$ expression are more susceptible to viral infection, with less apoptosis and more viral replication. I $\kappa B\alpha$ thus acts as a sensor of viral infection. Cleavage of host proteins by pathogen proteases is a novel mechanism by which the host recognizes and responds to viral infection.

Coxsackievirus | nitric oxide | Picornavirus

Apoptosis is an innate immune response to viral infection (1, 2). Virus infection can indirectly induce apoptosis of the host cell by stimulating immune effector cells, which in turn activate apoptosis of infected cells. Virus infection can also directly trigger apoptosis of host cells, but the mechanisms by which infected cells sense viral infection and activate programmed cell death are less well understood.

The family of NF- κB transcription factors not only activates proinflammatory pathways in innate and adaptive immunity, but also plays a critical role in preventing apoptosis (3–7). Human NF- κB is composed of a homodimer or heterodimer of proteins than belong to the rel family, including p65, p50, c-rel, and rel-B. NF- κB proteins are normally retained in the cytoplasm by members of the inhibitor of κB (I κB) family (4–6). However, a variety of agonists can stimulate cell signaling pathways that release NF- κB factors. NF- κB proteins then translocate into the nucleus and activate transcription of proinflammatory genes and also transcription of antiapoptotic genes, including *cIAP1*, *XIAP*, *c-FLIP*, *Bcl-2*, and *Bcl-xL*. NF- κB activation can prevent apoptosis that would otherwise be induced by cytotoxic proteins such as TNF- α . Activation of apoptosis by TNF- α depends in part on deactivation of NF- κB signaling (8–10). Inhibition of the antiapoptotic effects of NF- κB may be beneficial to the host during viral infection, decreasing viral replication and increasing host survival.

We hypothesized that components of the apoptotic pathway serve as intracellular sensors for viral infection. Host substrates in the apoptotic pathway that are cleaved by viral proteases might activate apoptosis, thereby limiting viral replication. We now show that the Coxsackievirus protease 3C^{pro} cleaves I $\kappa B\alpha$, generating an I $\kappa B\alpha$ fragment that represses NF- κB signaling, blocks the antiapoptotic effects of NF- κB , and decreases viral replication.

Results

Coxsackievirus B3 (CVB3) Induces Apoptosis. CVB3 infection of HeLa cells causes apoptosis, as detected by DAPI staining of

nuclear chromatin after infection, nucleosomal fragments, and poly(ADP-ribose) polymerase (PARP) cleavage (Fig. 1). Because NF- κB signaling regulates apoptosis, we next explored the effect of Coxsackievirus infection upon nuclear translocation of NF- κB . HeLa cells were infected with CVB3 for 0–240 min or treated with TNF- α for 30 min as a control, and nuclear localization of the NF- κB p65 subunit was assayed by immunoblotting and immunohistochemistry. After infection with CVB3, NF- κB appears in the nucleus, although more slowly than after TNF- α treatment. We therefore sought to characterize more fully the effects of viral infection upon NF- κB signal transduction.

CVB3 Infection Does Not Activate NF- κB . We then examined the effect of CVB3 infection on NF- κB activation. HeLa cells were infected with CVB3 or treated 30 min with TNF- α . Nuclear extracts were isolated and subjected to EMSA with radiolabeled NF- κB oligonucleotide DNA binding domain sequence (Fig. 2C Left). In addition, HeLa cells were transiently transfected with a κB -luciferase reporter construct, and then treated with TNF- α or CVB3 (Fig. 2C Right). TNF- α significantly increases NF- κB DNA binding and transactivation, as expected (Fig. 2C Left, lane 2; also Fig. 2C Right). However, CVB3 infection neither increases NF- κB DNA binding (Fig. 2C Left, lanes 3–5) nor transactivation of the reporter gene at any time after infection (Fig. 2C Right). Not only does CVB3 infection fail to activate a κB reporter construct, but in addition CVB3 inhibits TNF- α -mediated NF- κB transactivation (Fig. 7, which is published as supporting information on the PNAS web site). (These experiments included an internal control, cotransfection with a vector expressing *Renilla luciferase* driven by a CMV promoter.) Taken together, these data suggest a paradox: although CVB3 infection leads to nuclear localization of NF- κB , CVB3 inhibits NF- κB binding activity and transactivation.

CVB3 Infection Alters I $\kappa B\alpha$ Location. To study how CVB3 inhibits NF- κB binding and transactivation, we localized I $\kappa B\alpha$ in HeLa cells. CVB3 infection does not change steady-state levels of I $\kappa B\alpha$ (Fig. 3A). However, we detected an additional 30-kDa I $\kappa B\alpha$ fragment in infected HeLa cells, total cell extracts (Fig. 3A Upper), or nuclear extracts (Fig. 3A Lower). The fragment of I $\kappa B\alpha$ within the nucleus is bound to NF- κB , because immunoprecipitants prepared from nuclei of infected cells with antibody

Author contributions: C.Z. and M.S. contributed equally to this work; C.Z., M.S., and C.J.L. designed research; C.Z., M.S., E.Y.P., E.L.-R., and T.R.L. performed research; C.Z., S.L., and C.J.L. analyzed data; and C.Z. and C.J.L. wrote the paper.

The authors declare no conflict of interest.

This article is a PNAS direct submission.

Abbreviations: I $\kappa B\alpha$, inhibitor of $\kappa B\alpha$; PARP, poly(ADP-ribose) polymerase; CVB3, Coxsackievirus B3.

[†]To whom correspondence should be addressed. E-mail: czaragoza@cnic.es.

© 2006 by The National Academy of Sciences of the USA

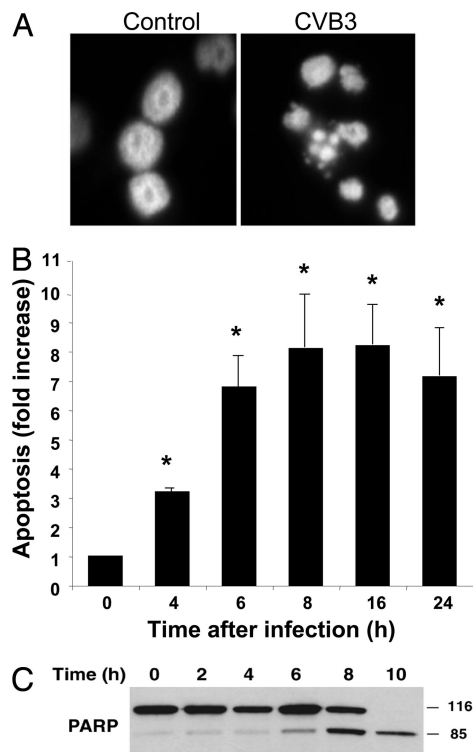


Fig. 1. CVB3 induces apoptosis in HeLa cells. HeLa cells were infected with CVB3 at a multiplicity of infection of 1, and apoptosis was measured by DAPI staining of nuclei (**A**), ELISA for the detection of a histone–DNA complex ($n = 3 \pm \text{SD}$; *, $P < 0.05$) (**B**), and Western blot of PARP in cell lysates (**C**). (Magnification: **A**, $\times 120$.)

to the NF- κ B p65 subunit contain the amino-terminal I κ B α fragment (Fig. 3*B*). These findings suggest that CVB3 infection leads to cleavage of I κ B α . Furthermore, a fragment of I κ B α enters the nucleus where it interacts with NF- κ B.

The CVB3 Protease 3C^{pro} Cleaves I κ B α . We postulated that the I κ B α -immunoreactive fragment detected after Coxsackievirus infection is generated by a viral protease cleaving I κ B α . The primary structure of I κ B α contains two consensus sequences for the CVB3 viral protease 3C^{pro}: AXXQG at residues 151–155 and QG at residues 249–250 (Fig. 3*C*). To determine whether or not 3C^{pro} can cleave I κ B α , we incubated recombinant 3C^{pro} with the recombinant 65-kDa fusion polypeptide GST-I κ B α and immunoblotted the mixture with antibodies to I κ B α . The 3C^{pro} protease cleaves recombinant I κ B α *in vitro* (Fig. 3*D*), as detected by immunoblotting with antibody to the amino terminus of I κ B α (Fig. 3*D*, lanes 2–4), and with antibody to the carboxyl terminus of I κ B α (Fig. 3*D*, lane 5). As a control, a partially inactive catalytic mutant 3C^{pro}(C147S) was unable to cleave I κ B α with high efficiency (Fig. 8, which is published as supporting information on the PNAS web site) (11).

To determine the precise location at which 3C^{pro} cleaves I κ B α , we constructed mutant I κ B α polypeptides lacking either one of the two 3C^{pro} recognition sequences, I κ B α (Q154G) or I κ B α (Q249G). The 3C^{pro} protease cleaves WT I κ B α and mutant I κ B α (Q154G) (Fig. 3*E*). However, 3C^{pro} protease cannot cleave mutant I κ B α (Q249G), suggesting that 3C^{pro} cleaves I κ B α between Q249 and G250 (Fig. 3*E*).

The I κ B α Fragment Enters the Nucleus and Retains p65 in the Nucleus. We next defined the location of the I κ B α fragment in the cell. We transfected HeLa cells with empty vector (control), vector

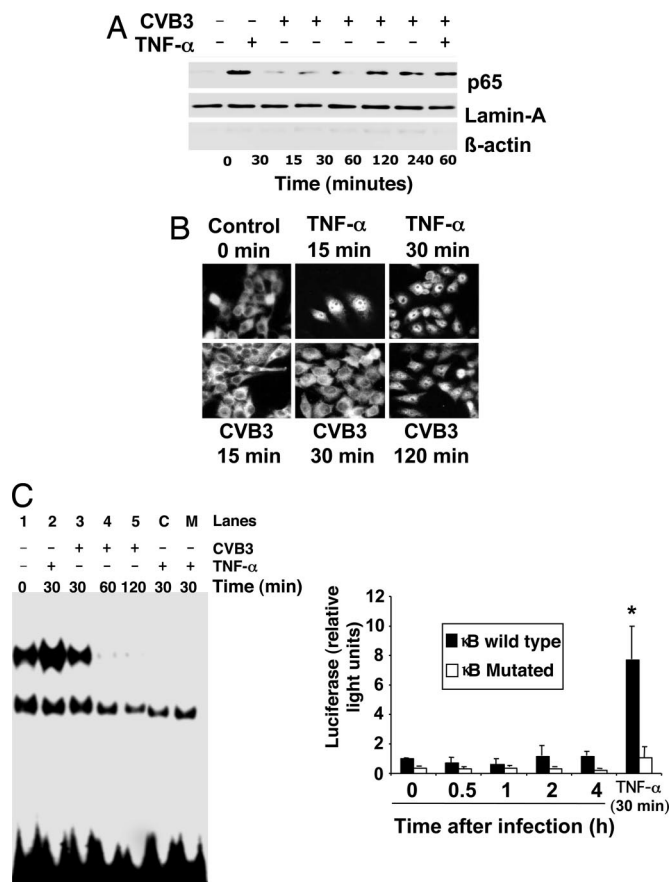


Fig. 2. NF- κ B activation is impaired during viral infection. (**A**) HeLa cells were treated with TNF- α or infected with CVB3, and nuclear extracts were harvested and immunoblotted with antibody to p65, lamin-A, and β -actin. (**B**) HeLa cells treated with TNF- α or infected with CVB3 for 0–120 min were analyzed by immunocytofluorescence with antibody to p65. CVB3 induces delayed translocation of NF- κ B into the nucleus after 120 min. (**C**) (*Left*) Nuclear extracts were isolated from HeLa cells infected with CVB3 at different time points or treated with TNF- α as before and subjected to EMSA assay with radiolabeled oligonucleotides containing the NF- κ B DNA binding domain sequence. In addition, extracts from TNF- α treated cells were incubated with a 100-fold of unlabeled oligonucleotide (lane C) and with a scrambled oligonucleotide for the NF- κ B binding sequence (lane M). (*Right*) HeLa cells were transfected with a WT or mutant κ B element-luciferase reporter construct, and then infected with CVB3 for 0–4 h or treated with TNF- α for 30 min, and luciferase expression was measured by a luminometer ($n = 3 \pm \text{SD}$; *, $P < 0.05$). Although NF- κ B enters the nucleus, the NF- κ B reporter gene is not expressed. (Magnification: **B**, $\times 40$.)

expressing WT I κ B α [I κ B α (WT)], or vector expressing the amino-terminal fragment of I κ B α generated by the viral protease [I κ B α (1–249)]. We treated these transfected cells with TNF- α to trigger NF- κ B translocation to the nucleus, and then washed away the TNF- α to allow the cells to return to rest. We then monitored the location of the NF- κ B p65 subunit and I κ B α .

Expression of the I κ B α fragment changes the location of NF- κ B. In control cells, NF- κ B normally is found in the cytoplasm; NF- κ B translocates to the nucleus after TNF- α treatment, and then NF- κ B is found in the cytoplasm again after TNF- α is washed away (Fig. 4*A* *Top*). Expression of WT I κ B α does not change this normal pattern NF- κ B localization (Fig. 4*A* *Middle*). However, expression of the I κ B α (1–249) fragment causes NF- κ B to remain in the nucleus after TNF- α is washed away (Fig. 4*A* *Bottom*).

Furthermore, the location of the I κ B α fragment is different from the location of the full-length I κ B α . The WT I κ B α is found

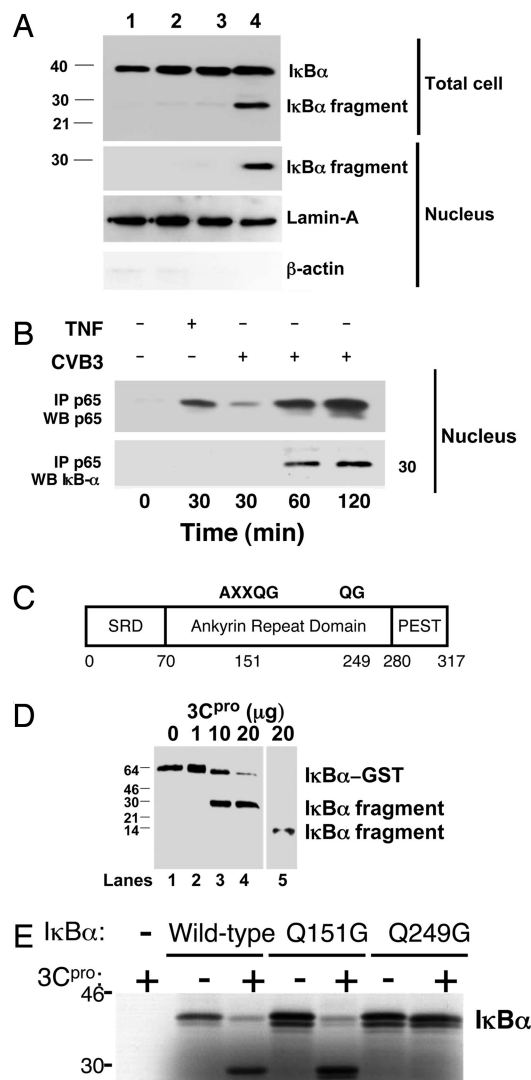


Fig. 3. The CVB3 viral protease $3C^{pro}$ cleaves $\text{IkB}\alpha$. (A) HeLa cells were treated with media alone (lane 1) or CVB3 for 15 min (lane 2), 30 min (lane 3), or 120 min (lane 4). Total cell lysates (*Upper*) and nuclear extracts (*Lower*) were immunoblotted with antibody to $\text{IkB}\alpha$, lamin-A, and β -actin. An $\text{IkB}\alpha$ fragment is present in infected cells. (B) HeLa cells were infected with CVB3 for 0–2 h or treated with $\text{TNF-}\alpha$ for 30 min, and nuclear extracts were immunoprecipitated with antibody to p65 and immunoblotted with antibody to p65 (*Upper*) or antibody to the N terminus of $\text{IkB}\alpha$ (*Lower*). CVB3 infection leads to the appearance of an $\text{NF-}\kappa\text{B}:\text{IkB}\alpha$ complex in the nucleus. (C) Schematic of the primary structure of $\text{IkB}\alpha$ with potential consensus $3C^{pro}$ cleavage sites at amino acid residues 151–155 and 249–250. Q is the P1 residue and G is the P1' residue of the consensus cleavage sites. SRD is the signal receiving domain. PEST is a domain rich in proline, glutamate, serine, and threonine residues. (D) $3C^{pro}$ cleaves $\text{IkB}\alpha$ *in vitro*. Recombinant $\text{GST-}\text{IkB}\alpha$ was incubated with recombinant $(\text{His})_6\text{-}3C^{pro}$, fractionated by SDS/PAGE, and immunoblotted with antibody to the N terminus of $\text{IkB}\alpha$ (lanes 2–4) or antibody to the C terminus of $\text{IkB}\alpha$ (lane 5). (E) $3C^{pro}$ cleavage of $\text{IkB}\alpha$ mutants *in vitro*. WT or mutant ^{35}S -labeled recombinant $\text{IkB}\alpha$ was incubated with recombinant $3C^{pro}$, fractionated by SDS/PAGE, and autoradiographed. $3C^{pro}$ cleaves $\text{IkB}\alpha$ (WT) and $\text{IkB}\alpha$ (Q154G) but not $\text{IkB}\alpha$ (Q249G).

in the cytoplasm of resting cells (Fig. 4*A Middle*). $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$ disappears from the cell during $\text{TNF-}\alpha$ treatment, and then $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$ accumulates again in the cytoplasm after $\text{TNF-}\alpha$ is removed (Fig. 4*A Middle*). In contrast, the $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$ fragment is found in the nucleus instead of the cytoplasm after $\text{TNF-}\alpha$ is washed away (Fig. 4*A Bottom*).

In summary, our data show that an I κ B α fragment is localized

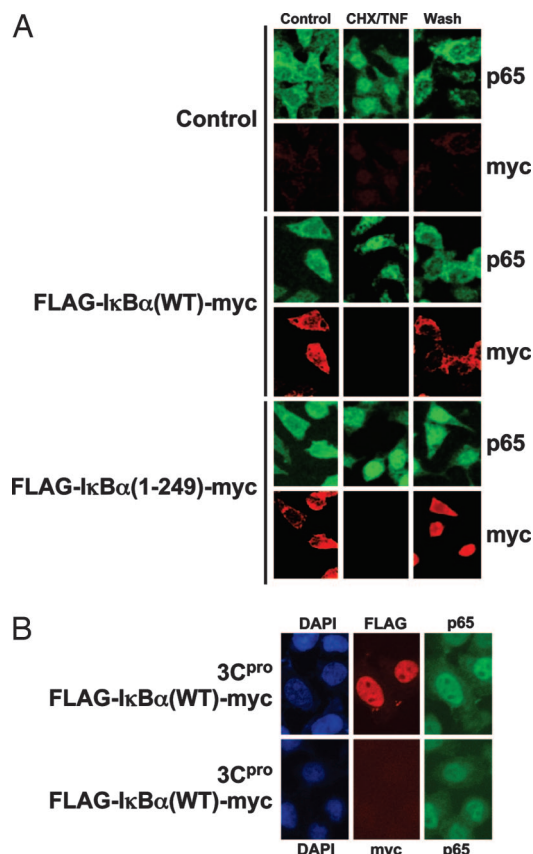


Fig. 4. The I κ B α fragment enters the nucleus and retains NF- κ B in the nucleus. (A) HeLa cells were transfected or not with a plasmid expressing the fusion protein FLAG-I κ B α (WT)-myc or an I κ B α fragment consisting of FLAG-I κ B α -(1–249)-myc, which corresponds to the I κ B α fragment generated by the viral protease. Transfected cells were washed with PBS, preincubated 90 min in serum-free medium with 100 μ g/ml cyclohexamide (CHX), and then treated for 30 min with 10 ng/ml TNF- α plus 100 μ g/ml CHX (CHX/TNF). The cells were then washed and subsequently incubated for 90 min in the absence of serum (Wash). Cells were fixed, permeabilized, and assayed for p65 (FITC, green) and I κ B α (Cy3, red) by confocal microscopy ($n = 3$). (B) HeLa cells were transfected with a plasmid expressing 3C^{pro} and cotransfected with a plasmid expressing the fusion protein FLAG-I κ B α (WT)-myc. Cells were treated as before and assayed for the FLAG-tagged amino-terminal I κ B α fragment or the myc-tagged carboxyl-terminal I κ B α fragment (red) and for p65 (green) ($n = 3$). (Magnification: $\times 60$.)

to the nucleus, and that expression of this fragment causes NF- κ B to remain in the nucleus.

The Viral Protease Generates an I κ B α Fragment That Remains in the Nucleus. To prove that the viral protease generates an I κ B α fragment, we overexpressed the viral protease 3C^{pro} in HeLa cells. We also expressed the full-length I κ B α and tagged the I κ B α at the amino terminus with FLAG and at the carboxyl terminus with c-myc. We again stimulated the transfected cells with TNF- α and followed the location of the amino terminus and carboxyl terminus of I κ B α .

The viral protease 3C^{Pro} leads to the appearance of the amino-terminus FLAG tag but not the carboxyl-terminus myc tag (Fig. 4B). This finding suggests that the viral protease generates an amino-terminal fragment of IκBα. Furthermore, the FLAG epitope is found in the nucleus, supporting the idea that the IκBα fragment translocates into the nucleus (Fig. 4B). Finally, the viral protease also causes NF-κB to colocalize with IκBα in the nucleus (Fig. 4B). In contrast, expression of full-length IκBα without the viral protease leads to normal NF-κB

Finally, expressing a cleavage-resistant I κ B α permits an increase in viral replication (Fig. 6D). These data suggest that I κ B α regulates apoptosis during viral infection.

Discussion

The major finding of our study is that a viral protease cleaves I κ B α , generating an I κ B α fragment. This I κ B α fragment enters the nucleus, interacts with NF- κ B, and inhibits NF- κ B transactivation. As a consequence, the antiapoptotic effects of NF- κ B are suppressed and apoptosis increases, thereby limiting viral replication. I κ B α may thus act as a host sensor for viral infection.

Coxsackievirus and other Picornaviruses cause apoptosis of infected cells *in vivo* and *in vitro* (12–17). Although expression of individual enterovirus polypeptides can cause apoptosis *in vitro*, it is unclear precisely how these viral polypeptides cause apoptosis (18–21). Our study shows that the Coxsackievirus protease 3C^{pro} is sufficient to cause apoptosis, in part by cleaving I κ B α .

Several lines of evidence suggest that the viral protease 3C^{pro} generates an I κ B α fragment that interrupts NF- κ B signaling. The viral protease generates an I κ B α fragment both *in vitro* (Fig. 3D) and in cells (Figs. 3A and 4B). The I κ B α fragment interacts with and retains NF- κ B in the nucleus (Figs. 3B and 4). The I κ B α fragment also increases apoptosis (Fig. 5C). Taken together, these data suggest that the I κ B α fragment generated by the viral protease can interfere with NF- κ B signaling.

Other laboratories have shown that host proteases can cleave I κ B α . Activation of apoptosis by TNF- α leads to caspase-3 cleavage of I κ B α *in vitro*, suppressing NF- κ B signaling and sensitizing cells to apoptosis (22, 23). Our data extend these previous studies by showing that viral protease cleavage of I κ B α can disrupt NF- κ B signaling, facilitate apoptosis, and decrease viral replication.

Because NF- κ B modulates many innate and adaptive immune pathways, disruption of NF- κ B signaling would be expected to have multiple consequences to the infected host. NF- κ B signaling may play a dual role during viral infection of the host. In noninfected cells activated by adjacent infected cells, activation of NF- κ B pathways may induce transcription of sets of genes, leading to enhanced expression of immune effector molecules. It is also possible that in infected cells viral infection shuts down NF- κ B-induced transcription of antiviral genes. Furthermore, in infected cells inactivation of NF- κ B may decrease transcription of antiapoptotic genes, increasing apoptosis of infected cells and limiting viral replication. Our data fit with studies by Knowlton and coworkers (24) that show that survival of *p50* null mice is greater than survival of WT mice after viral infection, in part because of increased apoptosis and decreased viral replication. These data of Knowlton and coworkers emphasize the importance of NF- κ B in regulating apoptosis during viral infection *in vivo*. The current study suggests that inactivation of NF- κ B signaling in infected cells is a direct consequence of viral protease processing of I κ B α .

The innate immune system recognizes pathogen-associated molecular patterns (PAMPs) that are necessary for the survival of specific pathogens. Viral proteases are PAMPs that play a critical role in the life cycle of Picornaviruses and many other RNA viruses. Susceptibility to viral proteases may be a novel mechanism by which the host recognizes and responds to viral infections.

Methods

Cells and Viruses. CVB3 (Nancy strain) was propagated in HeLa cells as described (13). The cells were cultured in MEM (Invitrogen, Carlsbad, CA) supplemented with 1% L-glutamate (100 mM), 100 units/ml penicillin, 100 μ g/ml streptomycin, and 10% FCS. Infected cells were fed in medium with 1% serum. Viral stocks were prepared by the infection of 150-cm² flask, 80–90% confluent monolayer culture of HeLa cells, at a mul-

tiplicity of infection of 1. Two days after incubation at 37°C, the cells were frozen and thawed three times, and the suspension was centrifuged. Viral supernatants were titered and stored at –80°C. Virus titers were performed by the plaque assay method (13). CVB3 stock titer was of 2×10^9 pfu/ml.

Assays for Apoptosis. Apoptosis was measured by several complementary techniques, including DAPI staining (Molecular Probes, Carlsbad, CA), immunoblotting for PARP (a caspase substrate) detection by immunoblot, an ELISA that detects oligonucleotides and histones released as result of apoptosis (Cell Death Detection ELISA; Roche, Indianapolis, IN), and flow cytometry analysis (FACS) using propidium iodide (Sigma, St. Louis, MO) and annexin V-FITC (Dakocytomation, Fort Collins, CO), following the manufacturer's instructions.

Western Blot Analysis. Cells were lysed in 1 \times lysis buffer (50 mM Tris, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, 0.17 μ g/ml PMSF, and 2 μ g/ml protein inhibitors: leupeptin, pepstatin, antipain, and antitrypsin). The homogenate was briefly centrifuged, and supernatants were collected. Proteins were quantified by Coomassie assay, and the samples were stored at –20°C. Fifty micrograms of cell homogenate was fractionated by SDS/PAGE and then transferred to a nylon membrane, blocked, incubated with primary antibodies and with secondary antibodies conjugated to HRP, and detected by chemiluminescence (ECL; Amersham, Piscataway, NJ). Human anti-PARP monoclonal antibody was from Trevigen (Gaithersburg, MD). Polyclonal anti-p65, I κ B α antibodies, polyclonal anti-Bcl2, polyclonal anti-Bcl-X_L, polyclonal anti-c-myc, polyclonal anti-lamin-A, polyclonal anti- β -actin, and monoclonal anti-GST antibody were from Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA). Monoclonal anti-FLAG was from Sigma.

Immunoprecipitation. Extracts from whole lysates or nuclear purified were precleared with control IgG corresponding to the host of the primary antibody, together with protein A-Sepharose. After centrifugation, the cell lysate was incubated overnight with the appropriate antibody and protein A-Sepharose. The pellets were collected by centrifugation, washed three times with RIPA buffer (0.15 mM NaCl/0.05 mM Tris-HCl, pH 7.2/1% Triton X-100/1% sodium deoxycholate/0.1% SDS), and resuspended with electrophoresis sample buffer.

Immunocytochemistry. HeLa cells were grown in cover slides and incubated with anti-p65 (Santa Cruz Biotechnology) and anti-N-terminal-I κ B α (Santa Cruz Biotechnology) or anti-p65 and anti-C-terminal-I κ B α (Santa Cruz Biotechnology) antibodies for 2 h. Covers were washed twice with PBS-0.1% BSA and then incubated with anti-FITC (p65, green), anti-Cy3 (I κ B, red), and Hoechst (nuclear detection, blue) for 1 h. Covers were washed four times with PBS-0.1% BSA and mounted in microscope slides for confocal microscopy visualization of the proteins.

Expression and Purification of Recombinant Proteins. CVB3 3C^{pro} was expressed in bacteria and purified as described (11). In brief, we constructed a prokaryotic expression vector encoding a fusion polypeptide encoding (His)₆-3C^{pro} (11). CVB3(His)₆-3C^{pro} was expressed in bacteria and purified by metal chelation chromatography, dialyzed, and stored at –80°C.

The I κ B α cDNA was kindly provided by Sankar Ghosh (Yale University, New Haven, CT). Mutant I κ B α expression vectors were constructed by site-directed mutagenesis using a kit (Stratagene, La Jolla, CA). Oligonucleotide primers used to generate mutant I κ B α constructs were: I κ B α (Q154G) primer, 5'-GCCTGTGAGGGGGGCT-3'; I κ B α (Q249G) primer, 5'-GT-TACCTACGGGGGC-3'. I κ B α (WT), I κ B α (Q154G), and I κ B α (Q249G) were expressed and ³⁵S-methionine-radiolabeled by

in vitro transcription and translation using the TNT Quick coupled transcription/translation system (Promega, Madison, WI).

GST-truncated I κ B α , which lacks the last 68 aa of WT I κ B α , was generated by PCR, and the resulting fragment was cloned into pGEX4T2 (GE-Amersham, Piscataway, NJ). The fragment was expressed in bacteria and purified by affinity chromatography, dialyzed, and stored at -80°C .

Flag-I κ B α -myc, and Flag-I κ B α_{T} -myc were generated by PCR and cloned in p3XFLAG-myc (Sigma) for eukaryotic expression.

Transient Transfection of Cells. HeLa cells were transiently transfected with 1 μg of DNA and 10 μl of Lipofectamine 2000 for 4 h, washed, and incubated with MEM/10% FCS for 16 h. The zinc-inducible 3C $^{\text{pro}}$ plasmid (pZn3C $^{\text{pro}}$) was constructed by ligating the coding sequence of CVB3 3C $^{\text{pro}}$ into the multiple cloning site of the mammalian expression vector pMEP4 (Invitrogen). Expression of 3C $^{\text{pro}}$ in HeLa cells transfected with this vector was induced with 100 μM ZnCl $_2$. NF- κ B transactivation was monitored by measuring luciferase activity expressed from a reporter vector containing the luciferase coding sequence driven by three κ B elements. Cells were cotransfected with a κ B promoter fused to a *Photinus luciferase* construct and also with a construct containing the constitutive promoter region of CMV fused to a *R. luciferase* gene. Every sample was then analyzed for *P. luciferase* content and also for *R. luciferase*, whose expression is independent of infection. Results were normalized by *R. luciferase* content.

Stable Transfection of HeLa Cells. The cDNA encoding WT and mutant I κ B α were subcloned into pCDNA3.1 (Invitrogen). To generate the stable cell lines that express I κ B α , six-well plates of HeLa cells were incubated with 2 μg of plasmid DNA mixed with the Lipofectamine 2000 reagent (Invitrogen) for 48 h and then

selected in media containing G418. After selection, the cells were maintained with 0.5 mg/ml of G418.

In Vitro Digestion of I κ B α by 3C $^{\text{pro}}$. Recombinant GST-I κ B α (Santa Cruz Biotechnology) or *in vitro*-transcribed and -translated I κ B α was incubated with affinity-purified 3C $^{\text{pro}}$ indigestion buffer (50 mM Tris-HCl, pH 7.5/0.1 M NaCl/1 mM EDTA) for 16 h at 30°C , fractionated by SDS/PAGE, and then analyzed by immunoblotting for I κ B α or autoradiographed.

RNA Interference. We performed gene silencing of I κ B α and GAPDH by transfecting HeLa cells with human I κ B α and GAPDH-validated siRNAs (Ambion, Austin, TX). Transfection was performed with Lipofectamine 2000 according to the manufacturer's instructions. Gene silencing was monitored by immunoblot of cell extracts isolated 24, 48, and 72 h after transfection. Controls were performed by transfection with a GAPDH siRNA or a scrambled siRNA (Ambion).

Statistical Analysis. All experiments were performed in triplicate, with the variability of data described by \pm SD. Comparisons were made with analysis of variance followed by Dunnett's modification of the *t* test, whenever comparisons were made with a common control. The level of statistical significance was defined as $P < 0.05$.

This work was supported by National Institutes of Health Grants HL63706, HL074061, HL65608, HL078635, and HL056091 (to C.J.L.), American Heart Association Grant 0140210N (to C.J.L.), Ministry of Science and Technology of Spain Grants SAF2002-00399 and SAF2005-06025 (to C.Z.) and SAF2000-0149 (to S.L.), "Programa Ramon y Cajal" Ministerio de Ciencia Y Tecnologia (C.Z. and M.S.), the Ciccarone Center (C.J.L.), and the John and Cora H. Davis Foundation (C.J.L.).

1. Roulston A, Marcellus RC, Branton PE (1999) *Annu Rev Microbiol* 53:577–628.
2. Benedict CA, Norris PS, Ware CF (2002) *Nat Immunol* 3:1013–1018.
3. Liu ZG, Hsu H, Goeddel DV, Karin M (1996) *Cell* 87:565–576.
4. Karin M, Lin A (2002) *Nat Immunol* 3:221–227.
5. Li Q, Verma IM (2002) *Nat Rev Immunol* 2:725–734.
6. Ghosh S, Karin M (2002) *Cell* 109(Suppl):S81–S96.
7. Beg AA, Sha WC, Bronson RT, Ghosh S, Baltimore D (1995) *Nature* 376:167–170.
8. Beg AA, Baltimore D (1996) *Science* 274:782–784.
9. Wang CY, Mayo MW, Baldwin AS, Jr (1996) *Science* 274:784–787.
10. Van Antwerp DJ, Martin SJ, Kafri T, Green DR, Verma IM (1996) *Science* 274:787–789.
11. Saura M, Zaragoza C, McMillan A, Quick RA, Hohenadl C, Lowenstein JM, Lowenstein CJ (1999) *Immunity* 10:21–28.
12. Henke A, Huber S, Stelzner A, Whitton JL (1995) *J Virol* 69:6720–6728.
13. Zaragoza C, Ocampo CJ, Saura M, McMillan A, Lowenstein CJ (1997) *J Clin Invest* 100:1760–1767.
14. Alter P, Jobmann M, Meyer E, Pankuweit S, Maisch B (2001) *Cardiovasc Pathol* 10:229–234.
15. Seko Y, Kayagaki N, Seino K, Yagita H, Okumura K, Nagai R (2002) *J Am Coll Cardiol* 39:1399–1403.
16. Carthy CM, Granville DJ, Watson KA, Anderson DR, Wilson JE, Yang D, Hunt DW, McManus BM (1998) *J Virol* 72:7669–7675.
17. Girard S, Couderc T, Destombes J, Thiesson D, Delpyroux F, Blondel B (1999) *J Virol* 73:6066–6072.
18. Goldstaub D, Gradi A, Bercovitch Z, Grossmann Z, Nophar Y, Luria S, Sonenberg N, Kahana C (2000) *Mol Cell Biol* 20:1271–1277.
19. Barco A, Feduchi E, Carrasco L (2000) *Virology* 266:352–360.
20. Li ML, Hsu TA, Chen TC, Chang SC, Lee JC, Chen CC, Stollar V, Shih SR (2002) *Virology* 293:386–395.
21. Kuo RL, Kung SH, Hsu YY, Liu WT (2002) *J Gen Virol* 83:1367–1376.
22. Barkett M, Xue D, Horvitz HR, Gilmore TD (1997) *J Biol Chem* 272:29419–29422.
23. Reuther JY, Baldwin AS, Jr (1999) *J Biol Chem* 274:20664–20670.
24. Schwarz EM, Badorff C, Hiura TS, Wessely R, Badorff A, Verma IM, Knowlton KU (1998) *J Virol* 72:5654–5660.

Extra View

Inhibitor of NF κ B α is a Host Sensor of Cocksackievirus Infection

Marta Saura¹

Tania R. Lizarbe²

Concepción Rama-Pacheco²

Charles J. Lowenstein³

Carlos Zaragoza^{2,*}

¹Departamento de Fisiología; Facultad de Medicina; Universidad de Alcalá; Alcalá de Henares, Spain

²Centro Nacional de Investigaciones Cardiovasculares; Instituto de Salud Carlos III; Madrid, Spain

³Division of Cardiology; Department of Medicine; Johns Hopkins University School of Medicine; Baltimore, Maryland USA.

*Correspondence to: Carlos Zaragoza; Centro Nacional de Investigaciones Cardiovasculares; Instituto de Salud Carlos III; Melchor Fernández Almagro 3, Madrid 28029 Spain; Tel.: +34.91.453.1200 ext. 2015; Fax: +34.91.453.1245; Email: czaragoza@cnic.es

Original manuscript submitted: 01/24/07

Revised manuscript submitted: 01/25/07

Manuscript accepted: 01/25/07

Previously published as a *Cell Cycle* E-publication:

<http://www.landesbioscience.com/journals/cc/abstract.php?id=3918>

KEY WORDS

apoptosis, viral infection, picornavirus, coxsackievirus, NF- κ B, I- κ B, 3C protease.

ABSTRACT

Apoptosis is a host response to viral infection: programmed cell death can limit viral replication. Therefore, the knowledge of pathways by which cells detect viral infection and activate apoptosis may be of considerable interest when developing strategies against viral pathogens. We have shown that cells activate apoptosis in response to Cocksackievirus B3 (CVB3) infection. In an effort to discover how cells detect viral infections, we found that the viral protease 3C^{pro} cleaves I κ B α . Truncated I κ B α forms a stable complex with NF κ B, translocates to the nucleus and inhibits NF κ B transactivation, increasing apoptosis and decreasing viral replication. In contrast, cells in which I κ B α expression is reduced are more susceptible to viral infection, showing less apoptosis and more viral replication. I κ B α thus acts as a sensor of viral infection. Cleavage of host proteins by pathogen proteases is a novel mechanism by which the host recognizes and responds to viral infection.

INTRODUCTION

Apoptosis is a mechanism by which the host can suppress intracellular infections.¹ Infection by a wide variety of viruses, including Picornaviruses, triggers apoptosis.²⁻²⁴ For example, poliovirus infection causes neuronal apoptosis in vivo,^{12,25,26} and Cocksackievirus infection leads to myocardial apoptosis in vivo.^{27,28}

Apoptosis of infected cells can be triggered by T lymphocytes or natural killer cells, through a perforin and granzyme mediated pathway.^{29,30} However, infected cells themselves can initiate apoptosis in the absence of immune cells. For example, Poliovirus and Cocksackievirus infection causes apoptosis of cells in vitro.^{19,22} However, the precise mechanism by which infected cells sense Cocksackievirus infection and initiate apoptosis is not completely understood. Expression of certain viral proteins is sufficient to cause apoptosis. The Cocksackievirus capsid polypeptide VP2,^{31,32} and the proteases 2A protease (2A^{pro}) or 3C protease (3C^{pro})^{13,20,23} lead to apoptosis; but it is unclear how these proteases trigger apoptosis.

The family of nuclear factor kappa B (NF κ B) transcription factors play a critical role in preventing apoptosis.³³⁻³⁷ Human NF κ B is composed of a homo- or heterodimer of proteins that belong to the rel family, including p65, p50, c-rel and rel-B. NF κ B proteins are normally retained in the cytoplasm by members of the inhibitor of κ B (I κ B) family.^{38,39} Stimuli that induce the release of NF κ B factors will cause NF κ B proteins to translocate into the nucleus and activate not only transcription of pro-inflammatory genes, but also transcription of anti-apoptotic genes, including cIAP1, XIAP, c-FLIP, Bcl-2 and Bcl-xL. NF κ B activation can prevent apoptosis that would otherwise be induced by cytotoxic proteins such as TNF- α . Activation of apoptosis by TNF- α depends in part upon deactivation of NF κ B signaling.^{40,41} Thus NF κ B activates transcription of anti-apoptotic genes.

Members of the NF κ B pathway are the target of different viruses. We found that Cocksackievirus infection causes the cleavage of another member of the family: I κ B α , by the viral protease 3C^{pro}, leading to cell death by apoptosis. Inhibition of the anti-apoptotic effects of NF κ B may be beneficial to the host during viral infection, decreasing viral replication and increasing host survival.

CVB3: STRUCTURE AND VIRAL LIFE CYCLE

Cocksackievirus B3 (CVB3) is an enterovirus of the Picornaviridae family, and is the most common cause of human viral myocarditis overall.⁴²⁻⁴⁴ The CVB3 genome is

composed of a single-stranded positive-RNA molecule which is organized into four sections: a 5' nontranslated region (5'NTR), a single open reading frame, a 3'NTR and a poly(A) tail. The CVB3 open reading frame is 7400 nucleotides long and encodes for a single 2185 amino acid polypeptide. The life cycle of Coxsackievirus is important for understanding the effect of the viral protease on I κ B α cleavage and apoptosis. Upon binding through the cell surface receptors CAR (coxsackievirus and adenovirus receptor) or DAF (decay accelerating factor, also known as CD55), the CVB3 genome is first translated into a viral polypeptide. After viral genome translation, viral proteases 2A^{Pro} and 3C^{Pro} process the viral polypeptide into viral sub-units, including structural proteins, regulatory proteins and the 3D^{Pol}, the RNA dependent RNA polymerase. The CVB3 virion is assembled from positive strand RNA and structural capsid proteins, and then exits the cell. In this context viral proteases are crucial to the viral life cycle, since they are responsible for the correct release of the structural and regulatory viral proteins during the entire CVB3 viral replicative cycle.

CVB3 AND APOPTOSIS

Coxsackievirus and other Picornaviruses cause apoptosis of infected cells in vivo and in vitro.^{9,24,27,45} Although expression of individual enterovirus polypeptides can cause apoptosis in vitro, little is known about the mechanism involved. Current research in this field has identified several host proteins involved in virus-mediated cell death. One of the molecules responsible for CVB3-induced apoptosis is the host protein Siva. Overexpression of Siva in different cell lines induces apoptosis; CVB3 infection induces the expression of Siva in hearts of infected mice. The capsid protein VP2 interacts with Siva, and the mechanism by which induces apoptosis is related to the binding to the pro-apoptotic CD27 protein.¹⁴ Nip21 is another example of a host gene that promotes apoptosis and decreases viral replication.⁴⁶ During CVB3-mediated myocarditis the chemokine IP10 (Gamma interferon-inducible protein-10) induces apoptosis and limits viral replication, suggesting that the tumor suppressor p53 is the downstream effector.⁴⁷ By contrast, other viruses have developed strategies to promote viral replication suppressing host-mediated apoptosis in a p53-dependent⁴⁸ and p53-independent ways.^{49,50} The glycogen synthase kinase 3 beta (GSK3 β) is another protein potentially involved in apoptosis. After infection, GSK3 β activity is significantly increased in HeLa cells, and blockage of GSK3 β activation inhibits CVB3 mediated apoptosis, suggesting that dysregulation of beta-catenin is the mechanism involved in GSK3 β -mediated cell death.⁵¹

More recently, viral proteases have been shown to be triggers of apoptosis of infected cells. We and others have found that viral proteases induce HeLa cell apoptosis by different ways: caspase-8 activation, Bid cleavage and cytochrome C release, and also by the cleavage of the translation initiation factor 4G1.²³ We found that Coxsackievirus protease 3C^{Pro} is sufficient to cause apoptosis, in part by cleaving I κ B α , which leads to the inactivation of the NF- κ B signaling in the nucleus of infected cells.²²

NF κ B SIGNALING AND VIRAL INFECTION

Since NF κ B modulates many innate and adaptive immune pathways, disruption or induction of NF κ B signaling would be expected to have multiple consequences. Millions of years of coevolution between viral pathogens and innate immune systems have generated a plethora of strategies targeting NF κ B signaling in both senses: activation or inhibition (for an excellent review see ref. 52).

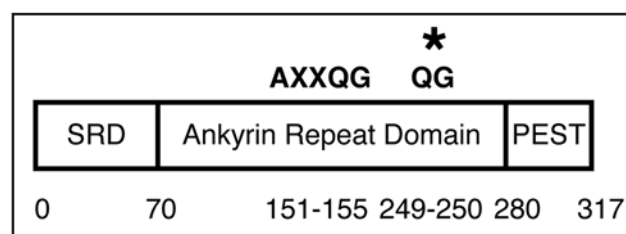


Figure 1. Schematic representation of the primary structure of I κ B α with potential consensus 3C^{Pro} cleavage sites at amino acid residues 151–155 and 249–250. Asterisk represents the preferred cleavage site for the CVB3 3C^{Pro}.

NF κ B signaling is induced by the host to clear virus infection. Extensive research in this field has identified viral targets responsible for NF κ B activation by the host.⁵² However, several viruses have evolved strategies to take advantage of NF κ B activation. This is the case human pathogens like HIV, cytomegalovirus, Herpesvirus, Papillomavirus or Epstein Barr virus, whose transcription is driven through NF κ B activation.^{53–57} Conversely, certain viruses induce the opposite effect, and repress immunity by inhibiting NF κ B.^{58–61} Our investigation revealed that CVB3 infection is an example of this strategy. Paradoxically, the apoptotic response induced by CVB3 in HeLa cells made possible to limit viral replication in the host.

CVB3 3C^{Pro} Cleaves I κ B α in HeLa Cells. We found that expression of 3C^{Pro} is sufficient to cause apoptosis in noninfected HeLa cells.²² In an effort to find host targets of this viral protease, we recognized that the NF κ B pathway was an attractive potential target for two reasons. First, others had previously found that p65RelA, a member of the NF κ B family, is cleaved in vitro by Poliovirus 3C^{Pro}; and second, NF κ B family members regulate cell survival and apoptosis. We therefore searched for potential viral protease cleavage sequences in the primary structure of NF κ B family members. The primary structure of I κ B α contains two consensus sequences for the CVB3 3C^{Pro} (Fig. 1). We found by targeting mutation of either site that the C-terminus proximal domain is the only target of the protease.²² When HeLa cells are infected with CVB3, 3C^{Pro} cleaves I κ B α at Q249–G250.

What is the effect of this novel I κ B α fragment produced by the viral protease? The I κ B α truncated fragment binds to NF κ B in the nucleus. This I κ B α -NF κ B complex inhibits NF κ B DNA binding (Fig. 2A) and NF κ B transactivation (Fig. 2B). However, the viral protease has no effect upon NF- κ B signaling in cells transfected with a mutant I κ B α resistant to 3C^{Pro} (I κ B α (Q249G)). The effect of CVB3 3C protease on NF- κ B inactivation, was demonstrated by the expression and purification a recombinant fusion polypeptide consisting of GST fused to the amino terminal fragment of I κ B α fragment generated by the viral protease (Fig. 3A). We incubated truncated I κ B α fragment (GST-I κ B α -T) with nuclear extracts from cells treated with TNF- α and radiolabeled κ B oligonucleotides, finding that I κ B α -T inhibits κ B binding activity (Fig. 3B). Taken together, these data support the hypothesis that the I κ B α -T fragment can directly interact with NF κ B, inhibit NF κ B interaction with κ B elements, and decrease NF κ B transactivation.

What is the effect of this I κ B α fragment upon viral replication? We found that blocking formation of the I κ B α fragment permits an increase in apoptosis and an increase in viral replication. Furthermore, our investigation also revealed that RNA silencing of I κ B α decreases apoptosis and increases viral replication in infected cells.²² These results show that the viral protease generates a I κ B α

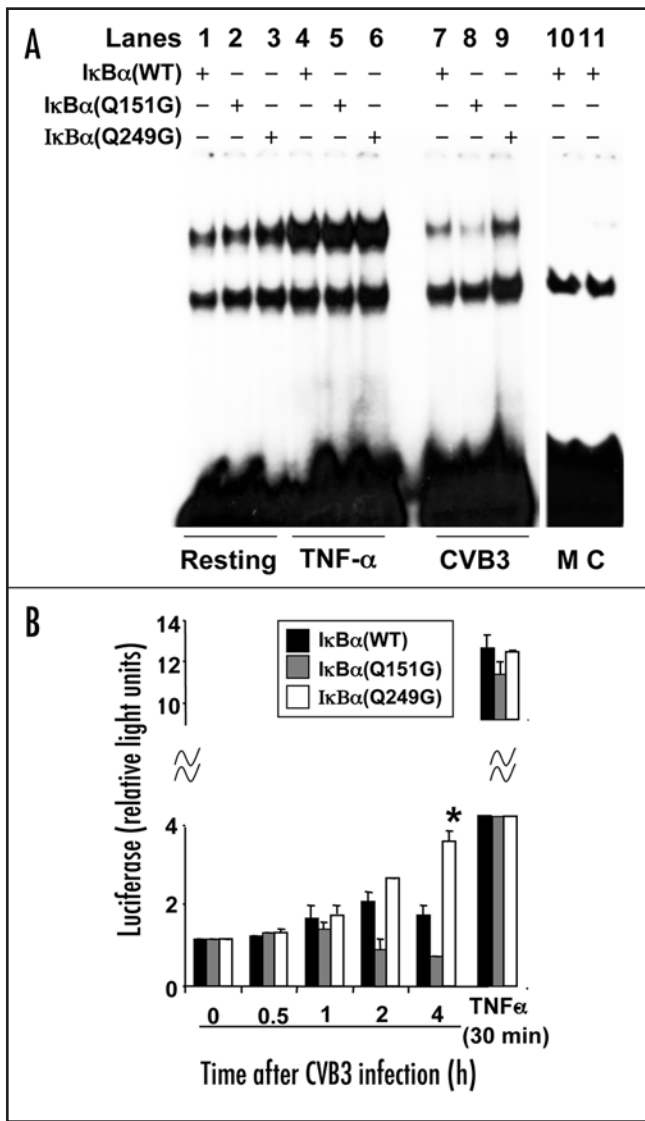


Figure 2. Mutant IκBα resistant to 3C^{pro} cleavage releases active NFκB. (A) HeLa cells were stably transfected with vectors expressing IκBα (WT) or IκBα (Q151G) or IκBα (Q249G), treated with TNF-α for 30 minutes, or infected with CVB3, and nuclear extracts were assayed for NFκB DNA binding activity. Some extracts were incubated with a radiolabeled mutated κB oligonucleotide (labeled M) or a nonlabeled κB oligonucleotide (labeled C). (B) HeLa cells were cotransfected with the κB-luciferase reporter vector, and also with vectors expressing IκBα (WT), IκBα (Q151G) or IκBα (Q249G). Cells were infected with CVB3 for 0–4 h, and luciferase expression was assayed with a luminometer. IκBα (Q249G) permits NFκB transactivation but IκBα (WT) does not.

fragment which turns off NFκB signaling. In the absence of NFκB transcription, apoptosis occurs which limits viral replication. Thus IκBα serves as a sensor for viral infection.

The innate immune system recognizes pathogen associated molecular patterns (PAMPs) that are necessary for the survival of specific pathogens. Viral proteases are PAMPs that play a critical role in the life cycle of Picornaviruses and many other RNA viruses. Susceptibility to viral proteases may be a novel mechanism by which the host recognizes and responds to viral infections.

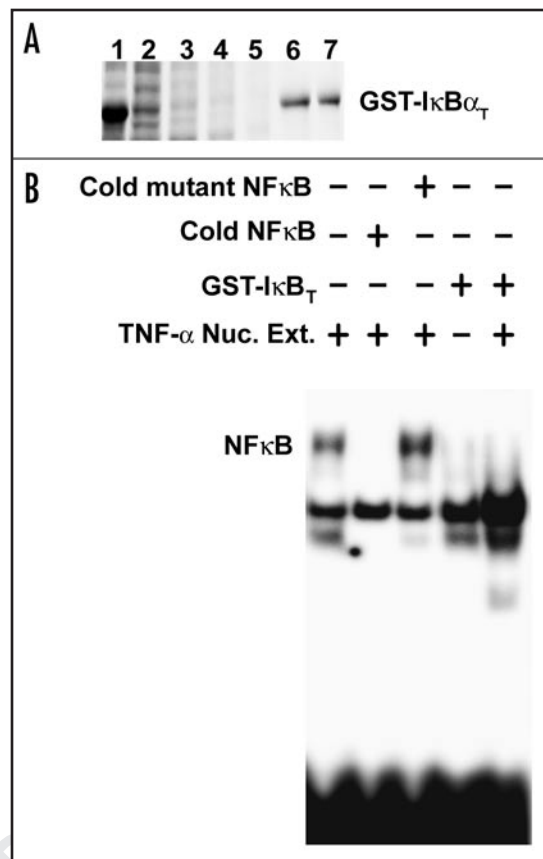


Figure 3. Truncated IκBα inhibits NFκB DNA binding in HeLa cells stimulated with TNF-α. (A) Expression and purification of recombinant GST-IκBα_T fragment. An expression vector was constructed that encoded a fusion polypeptide consisting of GST and the amino terminal fragment of IκBα generated by viral protease cleavage (IκBα_T). Recombinant GST-IκBα_T was expressed in bacteria and purified with a glutathione-agarose column. Lane 1: flow through, lanes 2–3: washes, lanes 4–7: elution with increasing concentrations of glutathione. (B) Recombinant GST-truncated IκBα (GST-IκBα_T) was incubated with HeLa cell extracts stimulated with TNF-α for 30 min, and subjected to gelshift analysis. Truncated IκBα inhibits the DNA binding of NFκB as result of the stimulation.

References

- Cuff S, Ruby J. Evasion of apoptosis by DNA viruses. *Immunol Cell Biol* 1996; 74:527-37.
- Agol VI, Belov GA, Bienz K, Egger D, Kolesnikova MS, Raikhlin NT, Romanova LI, Smirnova EA, Tolskaya EA. Two types of death of poliovirus-infected cells: Caspase involvement in the apoptosis but not cytopathic effect. *Virology* 1998; 252:343-53.
- Agol VI, Belov GA, Bienz K, Egger D, Kolesnikova MS, Romanova LI, Sladkova LV, Tolskaya EA. Competing death programs in Poliovirus-infected cells: Commitment switch in the middle of the infectious cycle. *J Virol* 2000; 74:5534-41.
- Ammendolia MG, Tinari A, Calcabrini A, Superti F. Poliovirus infection induces apoptosis in CaCo-2 cells. *J Med Virol* 1999; 59:122-9.
- Barco A, Feduchi E, Carrasco L. Poliovirus protease 3C(pro) kills cells by apoptosis. *Virology* 2000; 266:352-60.
- Carthy CM, Granville DJ, Watson KA, Anderson DR, Wilson JE, Yang D, Hunt DW, McManus BM. Caspase activation and specific cleavage of substrates after coxsackievirus B3-induced cytopathic effect in HeLa cells. *J Virol* 1998; 72:7669-75.
- Castelli J, Wood KA, Youle RJ. The 2-5A system in viral infection and apoptosis. *Biomed Pharmacother* 1998; 52:386-90.
- Castelli JC, Hassel BA, Wood KA, Li XL, Amemiya K, Dalakas MC, Torrence PF, Youle RJ. A study of the interferon antiviral mechanism: Apoptosis activation by the 2-5A system. *J Exp Med* 1997; 186:967-72.
- Colston JT, Chandrasekar B, Freeman GL. Expression of apoptosis-related proteins in experimental coxsackievirus myocarditis. *Cardiovasc Res* 1998; 38:158-68.

10. Drescher KM, Murray PD, Lin X, Carlino JA, Rodriguez M. TGF-beta 2 reduces demyelination, virus antigen expression, and macrophage recruitment in a viral model of multiple sclerosis. *J Immunol* 2000; 164:3207-13.
11. Gebhard JR, Perry CM, Harkins S, Lane T, Mena I, Asensio VC, Campbell IL, Whitton JL. Coxsackievirus B3-induced myocarditis: Perforin exacerbates disease, but plays no detectable role in virus clearance. *Am J Pathol* 1998; 153:417-28.
12. Girard S, Couderc T, Destombes J, Thiessen D, Delpeyroux F, Blondel B. Poliovirus induces apoptosis in the mouse central nervous system. *J Virol* 1999; 73:6066-72.
13. Goldstaub D, Gradi A, Bercovitch Z, Grosmann Z, Nophar Y, Luria S, Sonenberg N, Kahana C. Poliovirus 2A protease induces apoptotic cell death. *Mol Cell Biol* 2000; 20:1271-7.
14. Henke A, Launhardt H, Klement K, Stelzner A, Zell R, Munder T. Apoptosis in coxsackievirus B3-caused diseases: Interaction between the capsid protein VP2 and the proapoptotic protein siva. *J Virol* 2000; 74:4284-90.
15. Huber SA, Budd RC, Rossner K, Newell MK. Apoptosis in coxsackievirus B3-induced myocarditis and dilated cardiomyopathy. *Ann N Y Acad Sci* 1999; 887:181-90.
16. Jelachich ML, Lipton HL. Restricted Theiler's murine encephalomyelitis virus infection in murine macrophages induces apoptosis. *J Gen Virol* 1999; 80:1701-5.
17. Tolskaya EA, Romanova LI, Kolesnikova MS, Ivannikova TA, Smirnova EA, Raikhlin NT, Agol VI. Apoptosis-inducing and apoptosis-preventing functions of poliovirus. *J Virol* 1995; 69:1181-9.
18. Tsunoda I, Kurtz CI, Fujinami RS. Apoptosis in acute and chronic central nervous system disease induced by Theiler's murine encephalomyelitis virus. *Virology* 1997; 228:388-93.
19. Buenz EJ, Howe CL. Picornaviruses and cell death. *Trends Microbiol* 2006; 14:28-36.
20. Calandria C, Irurzun A, Barco A, Carrasco L. Individual expression of poliovirus 2Apro and 3Cpro induces activation of caspase-3 and PARP cleavage in HeLa cells. *Virus Res* 2004; 104:39-49.
21. Blondel B, Couderc T, Simonin Y, Gosselin AS, Guivel-Benhassine F. Poliovirus and apoptosis. *Prog Mol Subcell Biol* 2004; 36:151-69.
22. Zaragoza C, Saura M, Padalko EY, Lopez-Rivera E, Lizarbe TR, Lamas S, Lowenstein CJ. Viral protease cleavage of inhibitor of kappaBalpha triggers host cell apoptosis. *Proc Natl Acad Sci USA* 2006; 103:19051-6.
23. Chau DH, Yuan J, Zhang H, Cheung P, Lim T, Liu Z, Sall A, Yang D. Coxsackievirus B3 proteases 2A and 3C induce apoptotic cell death through mitochondrial injury and cleavage of eIF4G1 but not DAP5/p97/NAT1. *Apoptosis* 2006.
24. Joo CH, Hong HN, Kim EO, Im JO, Yoon SY, Ye JS, Moon MS, Kim D, Lee H, Kim YK. Coxsackievirus B3 induces apoptosis in the early phase of murine myocarditis: A comparative analysis of cardiovirulent and noncardiovirulent strains. *Intervirology* 2003; 46:135-40.
25. Couderc T, Guivel-Benhassine F, Calaora V, Gosselin AS, Blondel B. An ex vivo murine model to study poliovirus-induced apoptosis in nerve cells. *J Gen Virol* 2002; 83:1925-30.
26. Blondel B, Colbere-Garapin F, Couderc T, Wiroitus A, Guivel-Benhassine F. Poliovirus, pathogenesis of poliomyelitis, and apoptosis. *Curr Top Microbiol Immunol* 2005; 289:25-56.
27. Saraste A, Arola A, Vuorinen T, Kyto V, Kallajoki M, Pulkki K, Voipio-Pulkki LM, Hyypia T. Cardiomyocyte apoptosis in experimental coxsackievirus B3 myocarditis. *Cardiovasc Pathol* 2003; 12:255-62.
28. Huber S, Dohrman A, Sartini D, Budd RC. Reduced myocarditis following Coxsackievirus infection in cellular FLICE inhibitory protein-long form-transgenic mice. *Immunology* 2006; 119:541-50.
29. Regner M, Mullbacher A. Granzymes in cytolytic lymphocytes to kill a killer? *Immunol Cell Biol* 2004; 82:161-9.
30. Klingstrom J, Hardestam J, Stoltz M, Zuber B, Lundkvist A, Linder S, Ahlm C. Loss of cell membrane integrity in puumala hantavirus-infected patients correlates with levels of epithelial cell apoptosis and perforin. *J Virol* 2006; 80:8279-82.
31. Henke A, Nestler M, Strunze S, Saluz HP, Hortschansky P, Menzel B, Martin U, Zell R, Stelzner A, Munder T. The apoptotic capability of coxsackievirus B3 is influenced by the efficient interaction between the capsid protein VP2 and the proapoptotic host protein Siva. *Virology* 2001; 289:15-22.
32. Nestler M, Martin U, Hortschansky P, Saluz HP, Henke A, Munder T. The zinc containing pro-apoptotic protein siva interacts with the peroxisomal membrane protein pmp22. *Mol Cell Biochem* 2006; 287:147-55.
33. DeLuca C, Kwon H, Pelletier N, Wainberg MA, Hiscott J. NF-kappaB protects HIV-1-infected myeloid cells from apoptosis. *Virology* 1998; 244:27-38.
34. Chen C, Edelstein LC, Gelinas C. The Rel/NF-kappaB family directly activates expression of the apoptosis inhibitor Bcl-x(L). *Mol Cell Biol* 2000; 20:2687-95.
35. Bitko V, Shulyayeva O, Mazumder B, Musiyenko A, Ramaswamy M, Look DC, Barik S. The nonstructural proteins of respiratory syncytial virus suppress premature apoptosis by a NF-kappa B-dependent, interferon-independent mechanism and facilitate virus growth. *J Virol* 2006.
36. Goodkin ML, Ting AT, Blaho JA. NF-kappaB is required for apoptosis prevention during herpes simplex virus type 1 infection. *J Virol* 2003; 77:7261-80.
37. Xiong A, Clarke-Katzenberg RH, Valenzuela G, Izumi KM, Millan MT. Epstein-Barr virus latent membrane protein 1 activates nuclear factor-kappa B in human endothelial cells and inhibits apoptosis. *Transplantation* 2004; 78:41-9.
38. Ghosh S, Karin M. Missing pieces in the NF-kappaB puzzle. *Cell* 2002; 109(Suppl): S81-96.
39. Karin M, Lin A. NF-kappaB at the crossroads of life and death. *Nat Immunol* 2002; 3:221-7.
40. Beg AA, Baltimore D. An essential role for NF-kappaB in preventing TNF-alpha-induced cell death. *Science* 1996; 274:782-4.
41. Van Antwerp DJ, Martin SJ, Kafri T, Green DR, Verma IM. Suppression of TNF-alpha-induced apoptosis by NF-kappaB. *Science* 1996; 274:787-9.
42. Gauntt C, Huber S. Coxsackievirus experimental heart diseases. *Front Biosci* 2003; 8: e23-35.
43. Kim KS, Hufnagel G, Chapman NM, Tracy S. The group B coxsackieviruses and myocarditis. *Rev Med Virol* 2001; 11:355-68.
44. Tracy S, Chapman NM, Romero J, Ramsingh AI. Genetics of coxsackievirus B cardiomyopathy and inflammatory heart muscle disease. *Trends Microbiol* 1996; 4:175-9.
45. Martin U, Nestler M, Munder T, Zell R, Sigusch HH, Henke A. Characterization of coxsackievirus B3-induced apoptosis under in vitro conditions. *Med Microbiol Immunol (Berl)* 2004; 193:133-9.
46. Zhang HM, Yanagawa B, Cheung P, Luo H, Yuan J, Chau D, Wang A, Bohunek L, Wilson JE, McManus BM, Yang D. *Nip21* gene expression reduces coxsackievirus B3 replication by promoting apoptotic cell death via a mitochondria-dependent pathway. *Circ Res* 2002; 90:1251-8.
47. Zhang HM, Yuan J, Cheung P, Chau D, Wong BW, McManus BM, Yang D. Gamma interferon-inducible protein 10 induces HeLa cell apoptosis through a p53-dependent pathway initiated by suppression of human papillomavirus type 18 E6 and E7 expression. *Mol Cell Biol* 2005; 25:6247-58.
48. O'Shea CC, Fried M. Modulation of the ARF-p53 pathway by the small DNA tumor viruses. *Cell Cycle* 2005; 4:449-52.
49. Bellanger S, Blachon S, Mechali F, Bonne-Andrea C, Thierry F. High-risk but not low-risk HPV E2 proteins bind to the APC activators Cdh1 and Cdc20 and cause genomic instability. *Cell Cycle* 2005; 4:1608-15.
50. Heilman DW, Green MR, Teodoro JG. The anaphase promoting complex: A critical target for viral proteins and anti-cancer drugs. *Cell Cycle* 2005; 4:560-3.
51. Yuan J, Zhang J, Wong BW, Si X, Wong J, Yang D, Luo H. Inhibition of glycogen synthase kinase 3beta suppresses coxsackievirus-induced cytopathic effect and apoptosis via stabilization of beta-catenin. *Cell Death Differ* 2005; 12:1097-106.
52. Hiscott J, Nguyen TL, Arguello M, Nakhai P, Paz S. Manipulation of the nuclear factor-kappaB pathway and the innate immune response by viruses. *Oncogene* 2006; 25:6844-67.
53. Fontaine V, van der Meijden E, de Graaf J, ter Schegget J, Struyk L. A functional NF-kappaB binding site in the human papillomavirus type 16 long control region. *Virology* 2000; 272:40-9.
54. Gregory D, Hargett D, Holmes D, Money E, Bachenheimer SL. Efficient replication by herpes simplex virus type 1 involves activation of the IkappaB kinase-IkappaB-p65 pathway. *J Virol* 2004; 78:13582-90.
55. Mallardo M, Dragonetti E, Baldassarre F, Ambrosino C, Scala G, Quinto I. An NF-kappaB site in the 5'-untranslated leader region of the human immunodeficiency virus type 1 enhances the viral expression in response to NF-kappaB-activating stimuli. *J Biol Chem* 1996; 271:20820-7.
56. Prosch S, Staak K, Stein J, Liebenthal C, Stamminger T, Volk HD, Kruger DH. Stimulation of the human cytomegalovirus IE enhancer/promoter in HL-60 cells by TNFalpha is mediated via induction of NF-kappaB. *Virology* 1995; 208:197-206.
57. Swingle S, Morris A, Easton A. Tumour necrosis factor alpha and interleukin-1 beta induce specific subunits of NFkB to bind the HIV-1 enhancer: Characterisation of transcription factors controlling human immunodeficiency virus type 1 gene expression in neural cells. *Biochem Biophys Res Commun* 1994; 203:623-30.
58. Gedey R, Jin XL, Hinthong O, Shisler JL. Poxviral regulation of the host NF-kappaB response: The vaccinia virus M2L protein inhibits induction of NF-kappaB activation via an ERK2 pathway in virus-infected human embryonic kidney cells. *J Virol* 2006; 80:8676-85.
59. Revilla Y, Callejo M, Rodriguez JM, Culebras E, Nogal ML, Salas ML, Vinuela E, Fresno M. Inhibition of nuclear factor kappaB activation by a virus-encoded IkappaB-like protein. *J Biol Chem* 1998; 273:5405-11.
60. Seo T, Park J, Lim C, Choe J. Inhibition of nuclear factor kappaB activity by viral interferon regulatory factor 3 of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus. *Oncogene* 2004; 23:6146-55.
61. Shao R, Hu MC, Zhou BP, Lin SY, Chiao PJ, von Lindern RH, Spohn B, Hung MC. E1A sensitizes cells to tumor necrosis factor-induced apoptosis through inhibition of IkappaB kinases and nuclear factor kappaB activities. *J Biol Chem* 1999; 274:21495-8.